



Technische Universität München

Fakultät für Chemie

Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie

Lehrstuhl für Analytische Chemie

Zerstörungsfreie Analyse des Eisenkerns von Ferritin und Magnetoferritin mittels Raman-Mikrospektroskopie

Carolin Chantal Hartmann

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen
Universität München zu Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Michael Schuster
Prüfer der Disseration: 1. Prof. Dr. Reinhard Nießner
2. Prof. Dr. Martin Elsner

Die Dissertation wurde am 23.07.2019 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 02.10.2019
angenommen.

„Denn was man messen kann, das existiert auch.“

– Max Planck

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2016 bis Januar 2019 am Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie (IWC), Lehrstuhl für Analytische Chemie der Technischen Universität München (TUM) unter Leitung von o. Univ.-Prof. Dr. Reinhard Nießner angefertigt. Die Arbeit wurde finanziell von der International Graduate School of Science and Engineering (IGSSE) der TUM gefördert.

Zuerst gebührt mein herzlicher Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. Reinhard Nießner für die freundliche Aufnahme am Institut und für die Möglichkeit selbstständig und eigenverantwortlich an einem interessanten wissenschaftlichen Thema zu arbeiten. Weiterhin danke ich ihm für das entgegengebrachte Vertrauen und die Unterstützung durch richtungsweisende Diskussionen und konstruktive Ideen.

Prof. Dr. Martin Elsner danke ich für die richtungsweisenden Ratschläge, die mir bei Fertigstellung der Arbeit sehr geholfen haben.

Meiner Mentorin Dr. Natalia P. Ivleva danke ich herzlich für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die hervorragende Betreuung. Sie hat mich stets mit freudigem Engagement während der Zeit am Institut begleitet. Die vielen fachlichen Diskussionen halfen mir bei der Lösung von Problemen und Fragestellungen.

Ich danke meinen Projektpartnern Prof. Dr. Gil Westmeyer, Christoph Massner und Susanne Pettinger vom *Department of Nuclear Medicine (TUM School of Medicine/Klinikum Rechts der Isar)* und *Institute of Biological and Medical Imaging (Helmholtz Zentrum München/TUM)* für den regen und unterstützenden Austausch und die enge Zusammenarbeit im Rahmen des Projekts BIOMAG der IGSSE. Es war mir eine Freude, mit ihnen zu arbeiten.

Prof. Dr. Friedrich E. Wagner vom Physik-Department der TUM danke ich herzlich für die Analyse meiner Proben mittels Mößbauer-Spektroskopie und für die anregenden Gespräche und Unterstützung auf diesem Gebiet. Weiterhin bedanke ich mich bei Claudia Ott von der Professur für Synthese und Charakterisierung innovativer Materialien der TUM für die Analyse meiner Proben mittels Röntgenbeugung (XRD).

Ich danke den Kollegen meiner Arbeitsgruppe Philipp Anger, Elisabeth von der Esch, Oleksii Morgaienko, Christian Schwaferts und Ruben Weiß für die großartige

Arbeitsatmosphäre, Hilfsbereitschaft und die wertvollen Anregungen, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt Philipp Anger für die mehrfache und mühevollen Arbeit des Korrekturlesens. Christine Sternkopf danke ich für die stets schnelle und sorgfältige Bearbeitung der ICP-MS-Messungen und REM-Aufnahmen meiner Proben. Auch bedanke ich mich bei Christian Schwaferts für die REM-Aufnahmen und EDX-Analyse meiner Proben. Bei allen Kollegen bedanke ich mich für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, Hilfsbereitschaft und den regen Austausch.

Auch möchte ich mich besonders bei meiner lieben Freundin Angelika für die schöne gemeinsame Zeit sowohl am Institut als auch während des Forschungsaufenthaltes in Boston, USA, bedanken.

Herzlich danken möchte ich auch meinen Eltern, meiner Schwester und ihrem Mann, und meinem Freund Fabian, die mir stets mit Liebe, Verständnis und aufmunternden Worten zur Seite standen.

In Memoriam: Prof. Dr. Bruno Elschner, meinem lieben Großvater, der in mir durch seine Begeisterung von früh an das Interesse für die Naturwissenschaften geweckt hat und dem ich diese Arbeit widme.

PUBLIKATIONEN

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Fachzeitschriften veröffentlicht:

A. Nistler, C. Hartmann, C. Rümenapp, M. Opel, B. Gleich, N. P. Ivleva, R. Niessner and M. Seidel. Production and Characterization of Long-Term Stable Superparamagnetic Iron Oxide-Shell Silica-Core Nanocomposites. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2017**, 442, 497-503.

C. Massner, F. Sigmund, S. Pettinger, M. Seeger, C. Hartmann, N. P. Ivleva, R. Niessner, H. Fuchs, M. H. de Angelis, A. Stelzl, N. L. Koonakampully, H. Rolbieski, U. Wiedwald, M. Spasova, W. Wurst, V. Ntziachristos, M. Winklhofer and G. G. Westmeyer, Genetically Controlled Lysosomal Entrapment of Superparamagnetic Ferritin for Multimodal and Multiscale Imaging and Actuation with Low Tissue Attenuation. *Advanced Functional Materials* **2018**, 28, 1706793, 1-10.

C. Hartmann, M. Elsner, R. Niessner and N. P. Ivleva, Nondestructive Chemical Analysis of the Iron-Containing Protein Ferritin Using Raman Microspectroscopy. *Applied Spectroscopy* **2019**, doi.org/10.1177/0003702818823203.

Im Rahmen des 3-monatigen Forschungsaufenthalts von April 2017 bis Juni 2017 an der Northeastern University in Boston, USA, wurde folgende Publikation veröffentlicht:

C. Hartmann, R. Patil, C. P. Lin and M. Nieder. Fluorescence-Detection, Enumeration and Characterization of Single Circulating Cells In Vivo: Technology, Applications and Future Prospects. *Physics in Medicine & Biology* **2017**, 63, 01TR01, 1-17.

KURZFASSUNG

Ferritin ist ein ubiquitär verbreitetes Eisenspeicherprotein, das aus einer kugelförmigen Proteinschale mit einem äußeren und inneren Durchmesser von 12 nm bzw. 8 nm aufgebaut ist und einen Hohlraum besitzt, dessen besondere Eigenschaft die natürliche Bildung und Speicherung von Nanopartikeln *via* Biomineralisation ist. Informationen über die chemische Komposition und den strukturellen Aufbau des Nanopartikels sind wichtig für Anwendungen in der Medizin und Nanotechnologie. In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass die Raman-Mikrospektroskopie eine geeignete Methode für die zerstörungsfreie Analyse des Eisenkerns von Ferritin und Magnetoferritin ist.

Der erste Teil ist in vier Schritte gegliedert: (i) Synthese geeigneter Referenzmaterialien Ferrihydrit, Magnetit und Maghemit; (ii) Optimierung der Raman-Analyse; (iii) Vergleich der Raman-Spektren von Ferritin und Magnetoferritin mit Referenzspektren; (iv) Validierung der Raman-Analyse durch Mößbauer-Spektroskopie und Röntgenbeugungsanalyse als zwei unabhängige und komplementäre Methoden. Die Raman-Analyse offenbarte die Zusammensetzung des Eisenkerns von Ferritin aus Ferrihydrit ($\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 0,5 \text{H}_2\text{O}$) und von Magnetoferritin aus Magnetit (Fe_3O_4). Durch die im nächsten Schritt durchgeführte Raman-Analyse von Ferritin und Magnetoferritin soll die Eignung der Raman-Analyse des Eisenkerns in komplexeren Medien geprüft werden. Jedoch bedarf die Methode durch das niedrige Konzentrationsverhältnis von Eisenverbindungen zur biologischen Matrix weiterer Optimierung.

Im zweiten Teil werden Modelle für eine induzierte Umwandlung von Ferrihydrit zu Magnetit entworfen. Hierbei sollen Ansätze einer induzierten Reassemblierung des Eisenkerns von Ferritin zur Bildung des Magnetoferritins gefunden werden. Ergebnisse der Untersuchungen zeigten nach Zugabe ausgewählter Reduktionsmittel, Elektronentransporter und divalenten Eisenionen eine Umwandlung des Eisenhydroxids Ferrihydrit zu Goethit ($\alpha\text{-FeOOH}$) und Lepidokrokit ($\gamma\text{-FeOOH}$). Unter Sauerstoffausschluss konnte eine Umwandlung zu magnetischem Magnetit und dem verwandten Maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) beobachtet werden. Die Ermittlung einer enzymatisch induzierten Umwandlung von Ferrihydrit zu Magnetit erfolgte durch Zuhilfenahme eines dem Ferritin ähnlichen Encapsulin-Kompartiments. Die erzielten Ergebnisse zeigten die Möglichkeiten der Raman-Analyse für die Umwandlung von Ferrihydrit zu Magnetit, welche in zukünftigen Untersuchungen noch optimiert und validiert werden sollten.

ABSTRACT

Ferritin is a universal intracellular iron storage protein composed of a spherical protein shell with an outer and inner diameter of 12 nm and 8 nm, respectively, and an iron core located inside the cavity. The cavity of this protein acts like a reaction chamber for natural formation and storage of nano-sized particles via biomineralization. Knowledge on the chemical composition and structure of the iron core is highly warranted in the fields of nano technologies as well as biomolecules and medicine. Here, we show that Raman microspectroscopy (RM) is a suitable approach for a non-destructive analysis of proteins containing such nano-sized iron oxides. Our approach pillars on (i) synthesis of suitable reference materials, i.e. ferrihydrite, maghemite and magnetite nanoparticles; (ii) optimization of parameters for Raman spectroscopic analysis; (iii) comparison of Raman spectra from ferritin with apoferritin and our reference minerals; (iv) validation of Raman analysis by Mössbauer spectroscopy and X-ray diffraction as two independent complementary approaches. Our results reveal that the iron core of natural ferritin and magnetoferritin is composed of the iron(III)hydroxide ferrihydrite ($\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 0.5 \text{H}_2\text{O}$) and iron oxide magnetite (Fe_3O_4), respectively. Subsequently, ferritin and magnetoferritin were incorporated into lysosomes, testing the feasibility of the Raman microspectroscopy to analyze the iron core in more complex media. Due to the low iron compounds/biological matrix ratio, an optimization of the Raman set up is still required.

The second part of the thesis is devoted to models for an induced transformation from ferrihydrite to magnetite in order to discover new approaches for an induced reassembly of the iron core of ferritin to obtain magnetoferritin. The results of the experiments revealed the presence of goethite ($\alpha\text{-FeOOH}$) and lepidocrocite ($\gamma\text{-FeOOH}$) after addition of selected reducing agents, electron shuttle and divalent iron ions to ferrihydrite. Without oxygen a formation of magnetite and its related maghemite could be observed. The investigation of an enzymatically induced transformation from ferrihydrite to magnetite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) was carried out by means of encapsulin compartment which is similar to ferritin. For the determination of the iron core Raman microspectroscopy was employed. The results are the beginnings of this intention to show the possibilities for the transformation from ferrihydrite to magnetite. Further research in order to improve and validate the models is necessary.

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
2	Theoretische Grundlagen	5
2.1	Magnetische Nanopartikel auf Eisenoxidbasis	5
2.1.1	Physikalische und chemische Besonderheiten der Nanopartikel	5
2.1.2	Magnetismus in Abhängigkeit von der Partikelgröße	5
2.1.3	Eisenoxide und Eisenhydroxide	8
2.1.4	Allgemeine medizinische Anwendungsbereiche magnetischer Eisenoxid-Nanopartikel	11
2.1.5	Gesundheitliche Aspekte magnetischer Eisenoxid-Nanopartikel	12
2.2	Ferritine als biobasierte Nanopartikel	14
2.2.1	Ursprung und Funktion	14
2.2.2	Schematischer Aufbau von Apoferritin	15
2.2.3	Die Eisenkernbildung	18
2.2.4	Mögliche Anwendungsbereiche von Ferritin als biobasiertes Nanopartikel	20
2.2.5	Magnetoferritin	22
2.3	Raman-Analyse des Eisenkerns von Ferritin und Magnetoferritin	23
2.3.1	Physikalische Grundlagen der Raman-Spektroskopie	23
2.3.2	Allgemeiner Aufbau eines Raman-Spektrometers	29
2.3.3	Einsatz der Raman-Mikrospektroskopie für die Eisenkern-Analyse von Ferritin und Magnetoferritin	30
2.4	Methoden für die Validierung der Raman-Analyse	36
2.4.1	Mößbauer-Spektroskopie	37
2.4.2	Röntgenbeugung (XRD)	39
3	Experimenteller Teil	42
3.1	Raman-Mikrospektroskopie	42
3.1.1	Raman-Mikroskop <i>LabRAM HR</i>	42
3.1.2	Raman-Mikroskop <i>alpha300R</i>	43
3.2	Synthese der Nanopartikel	44
3.2.1	Synthese von Ferrihydrit	44
3.2.2	Synthese von Magnetit	45
3.2.3	Synthese von Maghemit	45

3.2.4	Raman-Analyse der Eisenoxid-Nanopartikel	46
3.2.5	Datenverarbeitung der Raman-Spektren.....	46
3.3	Herstellung von Magnetoferritin.....	46
3.4	Raman-Analyse der Ferritin-Proben	47
3.4.1	Allgemeine Vorschrift zur Aufbereitung der Ferritin-Proben	47
3.4.2	Raman-Analyse der Ferritin-Proben.....	48
3.4.3	Datenverarbeitung der Ferritin-Proben.....	49
3.5	Raman-Analyse von Ferritin in Lysosomen	49
3.6	Modellstudie: Reduktive Transformation von Ferrihydrit zu Magnetit.....	50
3.6.1	Experimenteller Aufbau.....	50
3.6.2	Raman-Analyse und Datenverarbeitung.....	52
3.7	Raman-Analyse des Encapsulin-Kompartiments.....	52
3.8	Weitere verwendete Methoden	52
3.8.1	Mößbauer-Spektroskopie.....	52
3.8.2	Röntgenbeugung (XRD).....	53
3.8.3	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS)	53
3.8.4	Rasterelektronenmikroskopie (REM).....	53
3.8.5	Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX).....	54
4	Ergebnisse und Diskussion.....	55
4.1	Raman-Analyse der Magnetit-, Maghemit- und Ferrihydrit-Nanopartikel.....	55
4.1.1	Synthese der Nanopartikel	55
4.1.2	Raman-Analyse der Nanopartikel.....	57
4.1.3	Validierung der Raman-Analyse mittels Mößbauer-Spektroskopie und Röntgenbeugung	62
4.1.4	Zusammenfassung der Raman-Analyse der Nanopartikel.....	66
4.2	Raman-Analyse von Ferritin	67
4.2.1	Fluoreszenz-Problematik bei der Raman-Analyse von Ferritin	68
4.2.2	Raman-Spektrum von Ferritin	70
4.2.3	Raman-Analyse des Eisenkerns von Ferritin.....	71
4.2.4	Validierung der Raman-Analyse mittels Mößbauer-Spektroskopie und Röntgenbeugung	74
4.2.5	Fazit der Raman-spektroskopischen Analyse von Ferritin.....	75
4.3	Raman-Analyse von Magnetoferritin.....	76
4.3.1	Raman-Spektrum von Magnetoferritin.....	76

4.3.2	Ansätze zur Verbesserung der Raman-Analyse von Magnetoferritin	80
4.3.3	Fazit aus der Raman-spektroskopischen Analyse des Eisenkerns von Magnetoferritin	84
4.4	Einschluss von Ferritin und Magnetoferritin in Lysosomen	85
4.4.1	Raman-Analyse von lysosomalem Ferritin und Magnetoferritin	86
4.4.2	Fazit zur Raman-spektroskopischen Analyse des Eisenkerns im lysosomalen Ferritin und Magnetoferritin	87
4.5	Modellstudie: Reduktive Transformation von Ferrihydrit zu Magnetit	88
4.5.1	Raman-Analyse der reduktiven Transformation	89
4.5.2	Zusammenfassende Bemerkung zu den drei Modellen	103
4.6	Raman-Analyse des Encapsulin-Kompartiments	106
5	Zusammenfassung und Ausblick	109
6	Literaturverzeichnis	114
A.	Anhang	114
B.	Chemikalien und Materialien	133
C.	Abkürzungsverzeichnis	136

1 EINLEITUNG

Die Generierung und Anwendungsmöglichkeiten magnetischer Nanopartikel sind ein multidisziplinäres Forschungsgebiet, das insbesondere in Biologie und Medizin intensiv erforscht wird. Der wohl wichtigste Grund hierfür ist die Transparenz von lebendem Gewebe für magnetische Felder. Dies ermöglicht ein zerstörungsfreies und tiefes Eindringen in den Körper und damit die Aktivierung magnetischer Nanopartikel im Zielgewebe [1]. Magnetische Nanopartikel finden in diversen Bereichen wie Bildgebung, Diagnostik oder auch der klinischen Therapie Anwendung. So werden sie beispielsweise als Kontrastmittel in Bildgebungsverfahren wie der Magnetresonanztomografie (MRT), zur Induktion einer therapeutischen Hyperthermie, als Transportmittel für bestimmte Arzneien (engl. *drug delivery*) oder zur Manipulation von Zellen eingesetzt.

Es gibt eine weitere Reihe von Eigenschaften, die magnetische Nanopartikel besonders interessant machen: (i) sie können mit hoher Monodispersität hergestellt werden; (ii) ihre größenabhängigen physikalischen Eigenschaften können für verschiedene Zwecke ausgenutzt werden; (iii) sie sind in der Lage, aufgrund ihrer kleinen Größe durch das Gewebe zu diffundieren und in Zellen einzudringen bzw. können mit Biomolekülen wie Proteinen, Genen und Viren in Wechselwirkung treten; (iv) sie können biokompatibel funktionalisiert werden; (v) sie können mit verschiedenen (organischen) Liganden funktionalisiert werden; (vi) sie können in ihren magnetischen Eigenschaften dahingehend optimiert werden, dass sie simultan mehrere Funktionen übernehmen, wie z.B. in Diagnostik und Therapie [2]. Die meisten gängigen Methoden verwenden künstlich hergestellte magnetische Eisenoxid-Nanopartikel mit hohen magnetischen Momenten. Um sie einsetzen zu können, wird eine geeignete Oberflächenbeschichtung benötigt. Diese sorgt zum einen dafür, dass eine stabile kolloidale Suspension aufrecht erhalten wird, und zum anderen dafür, dass die toxische Reaktivität der unbeschichteten Eisenoxidoberfläche (hohes Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis) abgeschirmt wird. Je nach Anwendungsbereich wird die Oberflächenbeschichtung mit entsprechenden Liganden, z.B. Dextrane, Polyethylenglykole (PEG) und Polyethylenimine (PEI), variiert [3].

Obwohl geringe Dosen von magnetischen Nanopartikeln in Form von Eisenoxiden mit geeigneter Oberflächenbeschichtung generell vom Körper toleriert werden [4], bewegt sich der Trend hin zur Verwendung natürlicher Nanopartikel. Besonders bei *in vivo* Anwendungen können natürliche Nanopartikel viele Vorteile gegenüber künstlichen

Nanopartikeln bieten [5]. Als natürliches magnetisches Nanopartikel kommt das Eisenspeicherprotein Ferritin infrage. Dieses Protein ist ubiquitär in der Natur verbreitet und ist aus einer kugelförmigen Proteinschale aufgebaut, mit einem äußeren und inneren Durchmesser von etwa 12 bzw. 8 nm. Im Inneren befindet sich ein Hohlraum, der die Kapazität besitzt bis zu 4500 Eisenatome in Form eines Kerns aufzunehmen. Seine strukturellen und biochemischen Eigenschaften können weitgehend in der Biotechnologie für biologische und medizinische Zwecke ausgenutzt werden. Ebenso können Ferritin oder Apoferritin, das der Proteinhülle ohne den Eisenkern entspricht, für Herstellungszwecke problemlos erworben werden. Das Apoferritin kann im Labor in großem Maßstab rekombinant hergestellt werden und anschließend mit Eisen oder weiteren Elementen für die Nanopartikelsynthese befüllt werden. Zudem ist die Proteinhülle von Ferritin beispielsweise thermostabil (bei 80 °C für 10 min [6]), was für einige Prozessschritte wie z.B. Aufreinigung von Vorteil sein kann. Des Weiteren ist die Proteinschale für chemische und biologische Modifikationen zugänglich [7].

Der Verwendung von natürlichem Ferritin beispielsweise als Kontrastmittel steht jedoch das sehr schwache resultierende Signal entgegen. Dies ist auf den nur wenig magnetisierbaren Kern von natürlichem Ferritin zurückzuführen. Im Hinblick darauf wird eine Modifikation von natürlichem Ferritin zu Magnetoferritin angestrebt, um durch eine höhere Magnetisierung des Eisenkernes den Kontrast zu erhöhen [5]. Die Modifikation von Ferritin zu Magnetoferritin basiert auf einer strukturellen Änderung des im natürlichen Eisenkern vorhandenen antiferromagnetischen Ferrihydrit ($\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 0,5 \text{H}_2\text{O}$) [8] zum magnetischen Eisenoxid Magnetit (Fe_3O_4) oder Maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$).

Das Projekt „Biomagnetic Interfaces for Non-Invasive Molecular Control“ (BIOMAG), das von der *International Graduate School of Science and Engineering* (IGSSE) der Technischen Universität München (TUM) gefördert wurde, kombiniert unterschiedliche Techniken der Biotechnologie und anschließende physikochemische Analysen, um magnetische Strukturen in Organismen zu generieren und zu charakterisieren. Durch das Projekt BIOMAG bestand eine interdisziplinäre Kooperation mit dem *Institute of Biological and Medical Imaging* (IBMI) der TUM, geleitet von Prof. Dr. Gil Westmeyer. Die Forschungsgruppe des IBMI beschäftigte sich mit der Entwicklung von Magnetoferritin als Kontrastmittel für die MRT und zur magnetischen Manipulation von Säugetierzellen, z.B. *Human Embryonic Kidney* (HEK)-Zellen [9].

Im Rahmen dieser Arbeit wird die Eignung der Raman-Spektroskopie als Methode zur physikochemischen Charakterisierung von Ferritin und Magnetoferritin untersucht. Als Raman-Effekt wird die inelastische Streuung von Photonen an der untersuchten Probe bezeichnet. Die Energie der Streustrahlung ist spezifisch für die Bindungen der angeregten Probe. Die Raman-Spektroskopie erzeugt damit *fingerprint*-Spektren, die eine eindeutige Zuordnung ermöglichen. Die Koppelung aus Raman-Spektroskopie und Mikroskopie wird Raman-Mikrospektroskopie (RM) oder auch Raman-Mikroskopie genannt. Mit dieser Methode ist eine Analyse im μm -Bereich möglich. Die Methode ist zerstörungsfrei und besitzt den für diese Anwendung großen Vorteil, gegenüber Wasser tolerant zu sein. Wasser ergibt nur ein sehr schwaches Raman-Signal und behindert damit die Analyse nicht. Dies ermöglicht es Proben im nativen Zustand zu untersuchen.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Identifizierung der Eisenverbindung im Proteinkern. Die einzelnen Eisenoxid- und Eisenhydroxidstrukturen können mittels RM aufgrund ihrer unterschiedlichen Kristallstruktur unterschieden werden. Im Rahmen dieser Arbeit werden drei Spezies untersucht. Zum einen steht Ferrihydrit ($\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 0,5 \text{H}_2\text{O}$) im Fokus, da der Eisenkern von natürlichem Ferritin aus dem hydrierten Eisen(III)hydroxid, zusammengesetzt ist. Zum anderem werden Magnetit (Fe_3O_4) und Maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) untersucht, die die einzigen Eisenoxide mit magnetischen Eigenschaften darstellen.

Referenzspektren für die Raman-Analyse des Eisenkerns im natürlichen Ferritin und Magnetoferritin sind essentiell. Im Labor werden Ferrihydrit-, Magnetit- und Maghemit-Nanopartikel synthetisiert und Raman-Spektren von diesen aufgenommen. Als Kontrollspektrum für Ferritin und Magnetoferritin wird das Raman-Spektrum von Apoferritin hergenommen. Die Validierung der erhaltenen Raman-Spektren erfolgt mit Hilfe der komplementären Methoden Mößbauer-Spektroskopie und Röntgenbeugung (XRD, engl. *X-ray diffraction*).

Im nächsten Schritt sollen Ferritin und Magnetoferritin nach erfolgreicher Synthese in Zellen inkorporiert werden. Beginnend mit kleinen Vesikeln wie Lysosomen soll die Komplexität der Matrix gesteigert (z.B. inkorporiert in Zellen) werden. Die besondere Herausforderung hierbei besteht in der Raman-spektroskopischen Analyse des vergleichsweise kleinen Eisenkerns inmitten einer in wesentlich größeren Anteilen vorhandenen biologischen Matrix.

Zusätzlich wird in Zusammenarbeit mit der Forschungsgruppe des IBMI nach Alternativen für Magnetoferritin gesucht. Inspiriert von den Zähnen der Käferschnecke *Acanthopleura hirtosa* [10] oder von den magnetotaktischen Bakterien wie *Magnetospirillum*

magnetotacticum [11], die eine ungewöhnliche Umwandlung von Ferrihydrit in Magnetit zeigen, sollen Modelle konzipiert werden, die die erneute Selbstassemblierung des Ferritinkerns von der Ferrihydrit-artigen Struktur zur Magnetit-Struktur auslösen. Die Raman-Analyse eignet sich hierbei zur Charakterisierung der Eisenformen und zur Untersuchung der möglichen Umwandlung und deren Verlauf.

Die erhaltenen Ergebnisse sollen helfen, die RM als schnelle und zerstörungsfreie analytische Technik für eisenhaltige Proteine zu entwickeln. Über Magnetoferritin als Kontrastmittel der MRT könnten beispielsweise mit Hilfe der RM Aussagen über die Signalausbeute getroffen werden und somit eine stetige Verbesserung dieser Kontrastmittelform ermöglicht werden. Außerdem könnten *in vivo* Anwendungen wie die zerstörungsfreie Untersuchung des Krankheitsverlaufes von neurodegenerativen Krankheiten wie Alzheimer, Parkinson oder Huntington von einer optimierten Raman-Analyse profitieren. Bei diesen Erkrankungen wurde ein erhöhter Anteil an Magnetit im Gehirn gefunden [12]. Magnetitablagerungen in den Blutgefäßen finden sich auch bei Patienten mit Atherosklerose [13]. In Zukunft könnte die RM durch die Analyse der biochemischen Prozesse im Krankheitsverlauf maßgeblich zur Heilung bzw. sogar Verhinderung des Krankheitsausbruchs beitragen.

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

2.1 MAGNETISCHE NANOPARTIKEL AUF EISENOXIDBASIS

2.1.1 PHYSIKALISCHE UND CHEMISCHE BESONDERHEITEN DER NANOPARTIKEL

Nanopartikel (aus dem griech. *nanos* für „Zwerg“ bzw. „zwerghaft“) sind Verbände von Atomen und Molekülen mit einer typischen Größenordnung von 1–100 nm [14, 15]. Ihre prägende Eigenschaft ist die durch das hohe Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis gekennzeichnete hohe Oberflächenenergie und damit verbunden die hohe Reaktivität [16]. Die Oberflächeneffekte führen zu Änderungen in Bezug auf Löslichkeit, Schmelzpunkt, die Adsorptionseigenschaften oder elektronischen Eigenschaften. Diese physikalischen und chemischen Eigenschaften der Nanopartikel können sich mit ihrer Größe ändern [16, 17].

2.1.2 MAGNETISMUS IN ABHÄNGIGKEIT VON DER PARTIKELGRÖSSE

Neben den chemischen, physikalischen und elektronischen Eigenschaften können sich auch die magnetischen Eigenschaften mit der Partikelgröße ändern. Magnetische Nanopartikel für medizinische und biologische Anwendungen können in paramagnetische, ferromagnetische und superparamagnetische Partikel eingeteilt werden. Im Allgemeinen definieren vor allem das Kernmaterial und die Größe und Form der Nanopartikel deren magnetische Eigenschaften.

Für das Verständnis ihres physikalischen Prinzips werden zunächst im Folgenden **Paramagnetismus**, **Ferromagnetismus** und **Superparamagnetismus** eingehender beleuchtet [3, 18]:

Paramagnetische Partikel besitzen Atome mit einem magnetischen Dipolmoment μ_A . In Abwesenheit eines externen magnetischen Feldes reagieren die Dipolmomente untereinander individuell, nicht interagierend und sind zufällig angeordnet. Wird ein externes magnetisches Feld angelegt, beginnen sich die Dipolmomente nach dem externen Magnetfeld auszurichten. Die Anzahl der ausgerichteten Dipolmomente nimmt mit der Stärke des externen Magnetfeldes zu. Die magnetische Sättigung ist dann vorhanden, wenn sich alle magnetischen Momente dem Feld angepasst haben. Dieses geschieht allerdings nur

bei sehr niedrigen Temperaturen oder sehr hoher magnetischer Feldstärke. Wird das externe Magnetfeld entfernt, gehen die Dipolmomente in ihre Ausgangslage aufgrund der thermischen Fluktuation zurück, ohne Remanenz zu zeigen (Abbildung 2.1 a). Unter Remanenz versteht man die Restmagnetisierung eines Materials nach Entfernen des externen Magnetfeldes.

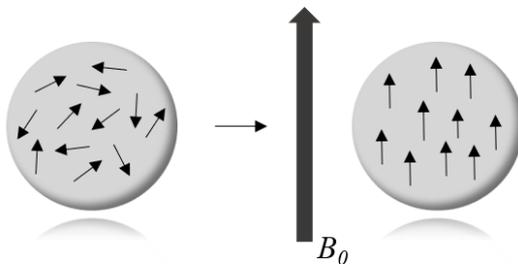
Ferromagnetische Materialien sind durch starke Wechselwirkungen geprägt. Die magnetischen Dipole sind in sogenannten Weiss-Bezirken organisiert, die durch Bloch- oder Néel-Wände getrennt sind. Als Weiss-Bezirk bezeichnet man kleine magnetisierte Domänen in den Kristallen eines magnetischen Materials. Alle magnetischen Dipole innerhalb eines Weiss-Bezirks sind in gleicher Richtung ausgerichtet. Dieses Arrangement bleibt bestehen, solange kein externes Magnetfeld angewendet wird. Wird ein externes Magnetfeld angelegt, so organisieren sich die Wände der Domänen um und das totale magnetische Moment sowie die Magnetisierung des ferromagnetischen Partikels beginnen sich nach dem äußeren Magnetfeld auszurichten. Anders als bei paramagnetischen Materialien zeigen ferromagnetische Materialien nach dem Entfernen des externen Magnetfeldes Remanenz. Die Magnetisierung des Partikels kann partiell oder vollständig beibehalten werden (Abbildung 2.1 b).

Die Anzahl der Weiss-Bezirke hängt vor allem von der Größe der Partikel ab. Mit Abnahme der Partikelgröße reduziert sich die Anzahl der Weiss-Domänen. Ist die Größe des Partikels kleiner als die Größe D_c , geht dieser multiple Domänen-Zustand in einen energetisch bevorzugten Single-Domänen-Zustand über. Diese Single-Domänen-Partikel besitzen demnach nur einen einzigen Weiss-Bezirk, in dem alle Dipolmomente in die gleiche Richtung zeigen.

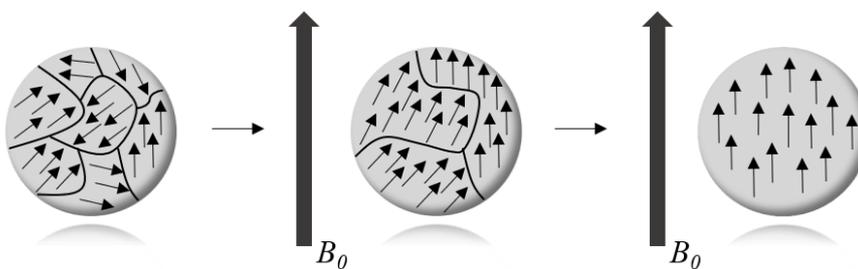
Wird die Partikelgröße weiter reduziert, so dass die D_c kleiner als die kritische Größe D_{sp} ist, zeigt der Partikel **superparamagnetische** Eigenschaften. Bei diesen Größen ($< D_{sp}$) werden die magnetischen Dipolwechselwirkungen durch thermische Fluktuationen ausgetauscht und somit eine zufällige Orientierung der Magnetisierung in Abwesenheit eines externen Magnetfeldes verursacht. Sie verhalten sich hier exakt wie paramagnetische Partikel. In Anwesenheit eines externen Magnetfeldes richten sich alle Dipolmomente nach dem Feld aus und zeigen nach Abschalten des externen Magnetfeldes keine Remanenz [19]. Durch diese Eigenschaft sind superparamagnetische Partikel deshalb interessant, da sie in Bezug auf ihre magnetischen Eigenschaften „an- und ausschaltbar“ sind. Sie zeigen also ihre magnetischen Eigenschaften nur in Anwesenheit eines magnetischen Feldes [1]. Zudem sind

extrem hohe Feldstärken oder niedrige Temperaturen für eine hohe Magnetisierbarkeit des Partikels wie beim Paramagnetismus nicht notwendig (Abbildung 2.1 c).

a) Paramagnetismus



b) Ferromagnetismus



c) Superparamagnetismus

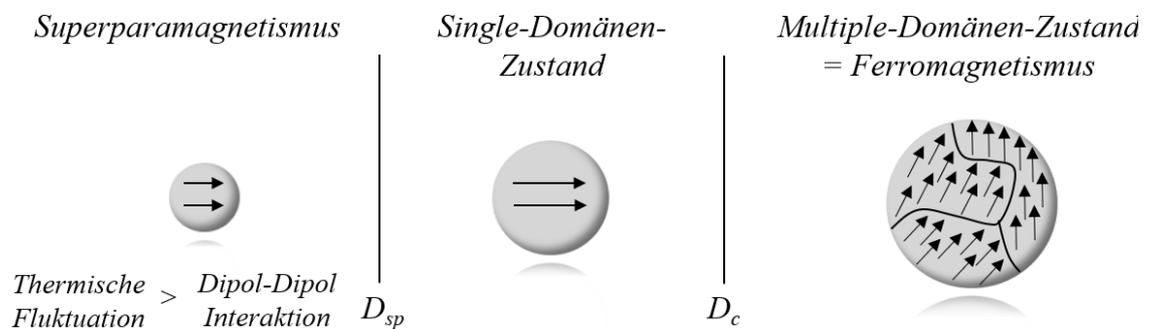


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung von Paramagnetismus (a), Ferromagnetismus (b) und Superparamagnetismus (c). Die Pfeile repräsentieren die Dipolmomente μ_A (a-c), B_0 ist die Stärke des extern angelegten Feldes (a, b). Die Bloch- oder Néel-Wände der Weiss-Bezirke in ferromagnetischen Materialien sind in Linien dargestellt (b, c). Superparamagnetismus tritt auf, wenn die Partikelgröße kleiner als die tolerierte Single-Domänen-Partikelgröße D_{sp} ist, wo thermische Fluktuationen im Gegensatz zu den Dipol-Dipol-Wechselwirkungen überwiegen. D_c ist der Partikeldurchmesser beim Übergang vom Multi-Domänen-Zustand zum Single-Domänen-Zustand (c).

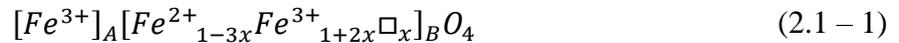
2.1.3 EISENOXIDE UND EISENHYDROXIDE

Nanopartikel auf Basis von Eisenoxiden und -hydroxiden sind aufgrund ihrer einzigartigen physikalischen und chemischen Eigenschaften vielfältig im Einsatz (z.B. Medizin, Optoelektronik, Farbstoffindustrie) [20]. In der Natur existieren mehr als zwanzig verschiedene Eisenoxide und -hydroxide [21], die sich in ihrer chemischen Zusammensetzung und Kristallstruktur unterscheiden und damit unterschiedliche chemische und physikalische Eigenschaften aufweisen [20]. Die Entstehung der jeweiligen Art des Kristalls wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Diese Einflussfaktoren sind beispielsweise Temperatur, Art der Vorstufe, aus der der Kristall gebildet wird, Reaktionsbedingungen, pH-Wert des umliegenden Mediums sowie die Atmosphärenbedingungen, denen der Kristall ausgesetzt ist [22]. Ebenso sind Eisenoxide und -hydroxide in der Lage sich ineinander umzuwandeln, besonders wenn sich die Umgebungsparameter des Kristalles geändert haben. Dies kann zufällig geschehen oder aber absichtlich induziert werden [22-29]. Die Größe des Minerals beeinflusst die Umwandlung von der einen Eisenoxid/-hydroxidform zur anderen. Diese erfolgt schneller in Nanopartikeln als in einem *Bulk*-Material [21].

Die vorliegende Arbeit thematisiert die Raman-Analyse des Eisenkerns von Ferritin. Daher werden die für die Arbeit relevanten Eisenoxide und -hydroxide Magnetit (Fe_3O_4), Maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) und Ferrihydrit ($\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 0.5 \text{H}_2\text{O}$) im Folgenden detaillierter dargestellt. Drei weitere bekannte Eisenformen Hämatit, Goethit und Lepidokrokit werden für ein besseres Verständnis als weitere Beispiele kurz erläutert.

Unter allen Eisenoxid-Verbindungen besitzen nur zwei Eisenoxide, die Magnetit (Fe_3O_4) und Maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) genannt werden, bei Raumtemperatur magnetische Eigenschaften. Magnetit kristallisiert als inverser Spinell der allgemeinen Formel AB_2O_4 [30, 31]. Für Magnetit gilt $\text{Fe}^{3+}[\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}]\text{O}_4$, wobei ein Drittel der Fe^{3+} -Ionen in den A-Positionen tetraedrisch von Sauerstoffatomen und zwei Drittel der Fe^{2+} - und Fe^{3+} -Ionen im Verhältnis 1:1 in den B-Positionen oktaedrisch von Sauerstoffatomen koordiniert sind. Im Gegensatz zu Magnetit befinden sich in Maghemit alle Ionen in Fe^{3+} -Zustand [30]. Die Fe^{2+} -Ionen im Kristall von Magnetit sind in Anwesenheit von Sauerstoff anfällig für Oxidation zu Fe^{3+} , was zu einer Umwandlung von Magnetit zum strukturell verwandten Maghemit führt [20, 21, 31]. Diese Oxidation kann entweder direkt an der Oberfläche erfolgen oder durch Diffusion von Fe^{2+} -Ionen vom inneren Partikelkern zur Oberfläche. Die Ionen oxidieren dann mit Sauerstoff zu Fe^{3+} [31]. Bei der Oxidation bilden sich im Kristall von Maghemit

Lücken in den oktaedrischen B-Stellen. Ihre Spinellstrukturen können zusammengefasst mit $x = 0$ für Magnetit und $x = 1/3$ für Maghemit gemäß folgender Summenformel 2.1 – 1 beschrieben werden, wobei \square die Lücke darstellt [32].



Anhand der Formel (2.1 – 1) kann somit Maghemit auch als Kationen-defiziente Form von Magnetit angesehen werden [32, 33].

Durch ihre strukturelle Verwandtschaft weisen beide Eisenoxide ähnliche Eigenschaften auf. Beide Eisenoxide sind ferromagnetisch [31] und werden industriell als superparamagnetische Nanopartikel für verschiedenste Anwendungsbereiche hergestellt [21]. Magnetit besitzt eine höhere magnetische Sättigung ($M_S \text{ Magnetit} = 92 - 100 \text{ emu/g}$) als Maghemit ($M_S \text{ Maghemit} = 60 - 80 \text{ emu/g}$) aufgrund der antiparallelen Wechselwirkungen zwischen den Elektronenspins der tetraedrisch koordinierten Fe^{3+} - und der oktaedrisch koordinierten Fe^{3+}/Fe^{2+} -Ionen [31]. Für medizinische Zwecke wird daher das höher magnetisierbare Magnetit bevorzugt. Dennoch punktet Maghemit in der strukturellen Stabilität über einen längeren Zeitraum [34].

Der Übergang vom Single-Domänen-Zustand zum superparamagnetischen Zustand geschieht bei Raumtemperatur bei einer Größe von 15 – 20 nm, der Übergang vom Single-Domänen-Zustand zum Multiplen-Domänen-Zustand bei einer Partikelgröße von 40 – 60 nm [32]. Für Anwendungen in der therapeutischen Hyperthermie werden Partikelgrößen 20 – 50 nm verwendet. Für MRI sind Partikelgrößen von etwa 10 nm unerlässlich [32].

Hämatit ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) ist die in der Natur am weitesten verbreitete Eisenoxid-Verbindung, da dieses Mineral eine hohe thermodynamische Stabilität aufweist [20]. Es ist isostrukturell dem Korund, der auch trigonal in der rhombohedralen Raumgruppe $R\bar{3}c$ kristallisiert (Abbildung 2.2 a) [20]. Bei Raumtemperatur weist Hämatit im Kontrast zu Magnetit und Maghemit keine magnetischen Eigenschaften auf und ist somit antiferromagnetisch. Oberhalb der sog. Morin-Temperatur (263 K für *Bulk*-Material, 210 K für Nanopartikel [35]) kann Hämatit schwache ferromagnetische Eigenschaften aufweisen, was durch die Reorientierung des Spins zustande kommt [35, 36].

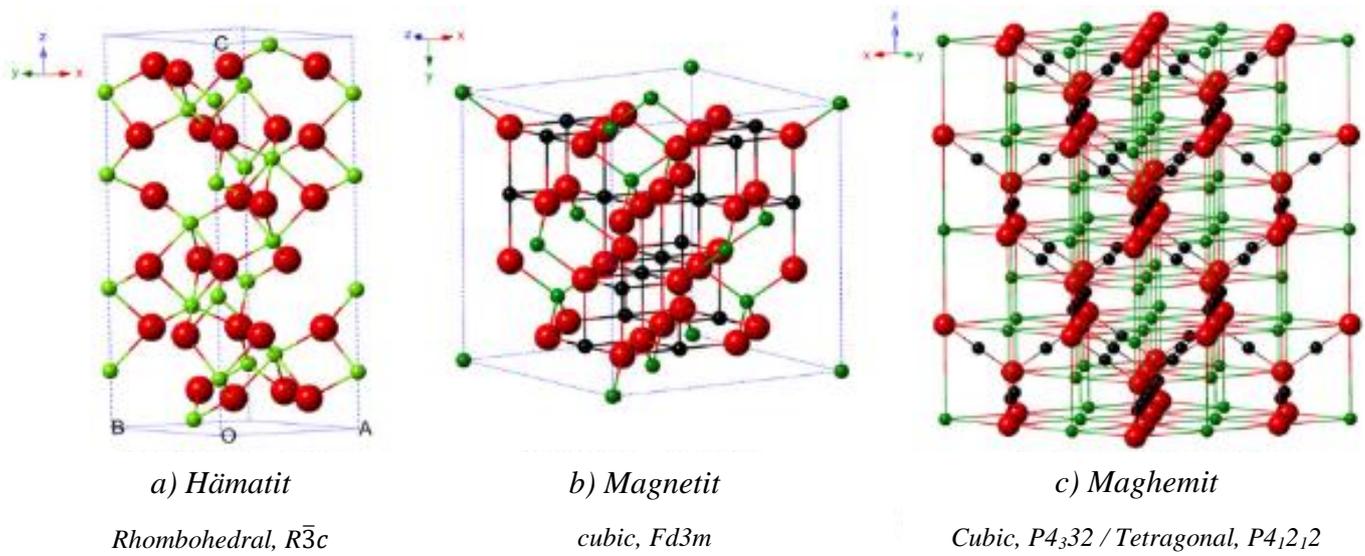


Abbildung 2.2: Kristallstrukturen von Hämatit (a), Magnetit (b) und Maghemit (c). Die schwarzen Kugeln repräsentieren Fe^{2+} -Ionen, die grünen Fe^{3+} -Ionen und die roten die Sauerstoffatome. Aus Wu et al., 2015 [37].

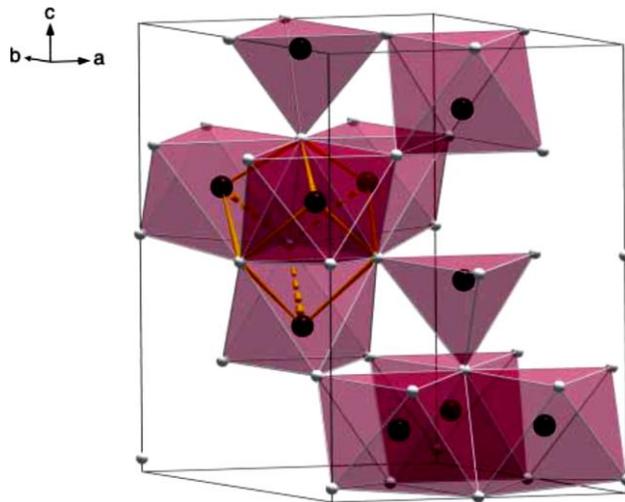


Abbildung 2.3: Kristallstruktur von idealem Ferrihydrit. Die schwarzen Kugeln stellen die Fe^{3+} -Ionen dar und die weißen die Sauerstoffatome. Aus Michel et al., 2007 [38].

Ferrihydrit ist ein stark hydriertes und schwach kristallines Eisen(III)oxyhydroxid, das in gleicher oder ähnlicher Form im Eisenkern des natürlichen Ferritins vermutet wird [8, 39, 40]. Eine besondere Eigenschaft dieses Minerals ist die nanokristalline Partikelgröße. Die durchschnittliche Größe ist kleiner als 10 nm [38]. Ferrihydrit kann als $Fe_2O_3 \cdot 0,5 H_2O$, oder $Fe_5HO_8 \cdot 4H_2O$ beschrieben werden, jedoch existiert keine allgemein akzeptierte

Summenformel [38]. Dies ist auf den variablen Wassergehalt und die Tatsache, dass die kristalline Struktur von Ferrihydrit noch nicht vollständig aufgeklärt ist [38], zurück zu führen. Ferrihydrit kristallisiert hexagonal in der Raumgruppe $P6_3mc$, wobei in seiner idealen Form 20 % der Eisenionen tetraedrisch und 80 % oktaedrisch angeordnet sind wie in Abbildung 2.3 gezeigt [38]. Die bekanntesten Ferrihydritformen sind 2-Linien- und 6-Linien-Ferrihydrit. Dieser Ausdruck stammt von der Röntgenbeugungsanalyse des Minerals, denn das schwächer kristalline 2-Linien-Ferrihydrit liefert im XRD zwei breite Banden, während das höher kristalline 6-Linien-Ferrihydrit sechs breite Banden liefert.

Neben Ferrihydrit existieren die miteinander eng verwandten Eisenhydroxide, die Goethit (α -FeOOH) und Lepidokrokit (γ -FeOOH) genannt sind. Beide kristallisieren im orthorhombischen Kristallsystem [22].

2.1.4 ALLGEMEINE MEDIZINISCHE ANWENDUNGSBEREICHE MAGNETISCHER EISENOXID-NANOPARTIKEL

Superparamagnetische Nanopartikel auf Eisenoxidbasis, wie Magnetit bzw. Maghemit, punkten vor allem durch ihre Eigenschaft im externen Magnetfeld manipuliert werden zu können oder das Signal in der MRT zu verstärken [41], ohne dass dabei hohe Feldstärken angelegt werden müssen [3]. Ihr Anwendungsspektrum liegt in der Bildgebung, Diagnostik oder auch der klinischen Therapie [1, 2].

Beim Transport von Medikamenten (engl. *drug delivery*) sind superparamagnetische Eigenschaften essentiell, um den Arzneistoff unter Einfluss eines externen Magnetfeldes an den gewünschten Zielort zu transportieren [15, 42]. Eine weitere Besonderheit der (magnetischen) Nanopartikel im medizinischen Bereich ist, dass sie durch ihre geringe Größe biologische Barrieren wie z.B. die Darmwand, Mundschleimhaut, Blutgefäßwände oder Hirn-Blut-Schranke überwinden und aufgenommen werden können [43, 44].

Die MRT kann besonders von eisenhaltigen superparamagnetischen Nanopartikeln als Kontrastmittel profitieren. Die MRT ist ein bildgebendes Verfahren, das auf der Relaxationszeit der Resonanz der Wasserstoffprotonen in der Nähe der Zellen basiert. Die aus der sog. T1 (longitudinal)- und T2 (transversal)-Relaxation resultierenden Bilder sind unterschiedlich. Wasserreiche Gewebe, z.B. Cerebrospinalflüssigkeit, erscheinen dunkel in T1-gewichteten Bildern und hell in T2-gewichteten Bildern. Fettreiche Gewebe sind hell in T1-gewichteten Bildern und grau in T2-gewichteten Bildern. Mit einer Verkürzung der

Relaxationszeit kann eine Verbesserung des Signals erreicht werden. Kontrastmittel basierend auf Gadolinium führen beispielsweise zu einer Reduktion der T1-Relaxationszeit und liefern daher einen positiven (hellen) Kontrast [45]. Kontrastmittel basierend auf Eisenoxiden verkürzen die T2-Relaxationszeit und erscheinen hypointensiv in T2-gewichteten Bildern [46].

2.1.5 GESUNDHEITLICHE ASPEKTE MAGNETISCHER EISENOXID-NANOPARTIKEL

Eine wesentliche Anforderung für den Einsatz von Eisenoxidnanopartikeln in der Biologie und Medizin ist ihre Biokompatibilität. Durch geeignete Oberflächenbeschichtung kann diese in der Regel gewährleistet werden [4]. Die Oberflächenbeschichtung trägt dazu bei, dass die Agglomeration in physiologischen Bedingungen verhindert wird und stabile kolloidale Suspensionen beibehalten werden [1, 3]. Blanke Eisenoxide haben eine hydrophobe Oberfläche mit hoher Oberflächenenergie. Fehlt eine entsprechende Beschichtung der Oberfläche, neigen die Partikel zu Agglomeration zu größeren Clustern, die dadurch starke Dipol-Dipol-Kräfte bilden und daraus ferromagnetische Eigenschaften aufweisen. Wenn zwei ferromagnetische Cluster sich nähern, gelangt jeder in das Magnetfeld des Nachbarn, was die Bildung größerer Partikel bewirkt. Aufgrund der dann auftretenden Van-der-Waals-Wechselwirkungen könnten dann die größeren Partikel ausflocken [1]. Diese agglomerierten Partikel können schwerwiegende Nebenwirkungen hervorrufen, wie z.B. Thrombose in Blutgefäßen [47].

Oberflächenbeschichtungen müssen nicht nur die Biokompatibilität gewährleisten, sie müssen auch mit multifunktionellen Liganden ausgestattet werden, um ihre gewünschten Funktionen im Einsatz zu erfüllen. In der Forschung haben sich diverse Oberflächenbeschichtungen wie z.B. Organosilane, Dextrane und Polyethylenglykol (PEG) und Polyethylenimine (PEI) etabliert. Jedoch existieren auch Berichte, dass Oberflächenmaterialien eine potenzielle Toxizitätsquelle darstellen können. Beispielsweise können die positiven Ladungen der Imine des Alkyl-Polyethylenimins (PEI) Zytotoxizität verursachen [48].

Die Pharmakokinetik beschreibt die Gesamtheit aller Prozesse, denen ein Arzneistoff oder in diesem Fall beschichtete Nanopartikel im Organismus unterliegen. Gemäß dem ADME-Modell werden Arzneistoffe und Nanopartikel nach Parametern wie der Absorptionsrate und -ausmaß (Absorption), der Verteilung des Arzneimittels (Distribution), der biochemischen

Reaktionen wie Um- und Abbau (Metabolismus) und ihrer Ausscheidung (Elimination/Exkretion) beurteilt [49]. Die Ermittlung der Toxizität bestimmter Substanzen erfolgt häufig *in vitro* mit Hilfe von Zellmodellen, anhand derer die kritischen Parameter wie biologische Antwort zu Nanomaterialien, ihre Größe, Komposition, Oberflächenreaktivität, Architektur und Stabilität beurteilt werden. Bei einer *in vivo* Evaluierung können viele der oben genannten Parameter hingegen nicht mehr kontrolliert werden [50, 51] und somit können keine genauen Rückschlüsse gezogen werden. Beispielsweise konnte eine höhere intrazelluläre Sequestration der Giftstoffe *in vivo* als auch *in vitro* beobachtet werden [50].

Der menschliche Körper besitzt ein zuverlässiges Abwehrsystem, das in der Lage ist Fremdkörper, unter anderem auch Nanopartikel, zu eliminieren, z.B. die Zellen des Retikuloendothelialen Systems (RES), die Kupffer-Zellen in der Leber und die Makrophagen in der Milz [2, 4, 43, 52]. Jedoch muss der Aufenthalt magnetischer Nanopartikel im Körper, insbesondere bei Überdosierung, mit Vorsicht betrachtet werden. Diese mögen zwar schnell vom RES-System oder von den Kupffer-Zellen bzw. Milzmakrophagen aus dem Zirkulationssystem entfernt werden, werden aber nicht unbedingt unmittelbar vom Körper ausgeschieden [4, 52]. Die persistente Akkumulation von Nanopartikeln vor allem in Leber und Milz ist ein ernstzunehmender Aspekt. Zwar besitzen einige Proteine wie Ferritin und Hämosiderin die Fähigkeit überschüssiges Eisen aufzunehmen und in nicht toxischer Form zu speichern, jedoch ist ihre Speicherkapazität begrenzt [50]. Die Verhinderung der Akkumulation der Nanopartikel im Organ ist in der biomedizinischen Anwendung notwendig, um potenzielle Zytotoxizität zu vermeiden [52].

Ein weiteres Problem ist die Bildung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). ROS können als Verteidigungsmechanismus gegen eindringende Fremdkörper und somit gegen Eisenoxid-Nanopartikel dienen. ROS können aber auch zum Zelltod (Apoptose) führen. Obwohl die meisten Zellen einen Mechanismus entwickeln, der eine gewisse Menge an ROS puffert, ist das Risiko bei Überschuss an ROS zur Auslösung des oxidativen Stresses vorhanden [4].

Ein weiteres Problem ist die Wechselwirkung der magnetischen Nanopartikel mit biologischen Molekülen. Aufgrund ihrer Ladung der Partikeloberfläche sind Serumproteine dazu geneigt, sich an die magnetische Oberfläche zu binden [4].

2.2 FERRITINE ALS BIOBASIERTE NANOPARTIKEL

2.2.1 URSPRUNG UND FUNKTION

Ferritine sind ubiquitär vorkommende Proteine in terrestrischen Organismen (aerob und anaerob). Sie kommen sowohl in Eukaryoten, Bakterien und Archaeen vor [8, 53]. Alle Ferritine sind aus Untereinheiten aufgebaut, die sich zu einer hohlen Proteinkugel anordnen und in deren Hohlraum ein Eisenkern eingelagert ist [53].

Primär erfüllen diese Proteine eine duale Funktion als Eisenspeicherprotein und zur Eisendetoxifikation [39, 53]. Eisen ist ein essentielles Spurenelement, das für viele zelluläre Funktionen eine bedeutende Rolle spielt, wie zum Beispiel beim Elektronen- und Sauerstofftransport, als Katalysator für biochemische Prozesse, bei der Stickstofffixierung und der Desoxynukleotid-Synthese. Ein Mangel an Eisen hat eine Beeinträchtigung der Zellfunktionen zur Konsequenz. Gleichzeitig weisen aber freie Fe^{2+} -Ionen, die nicht an Proteine gebunden sind, eine hohe Toxizität auf aufgrund ihrer Fähigkeit reaktive Sauerstoffspezies (ROS), Superoxide und Peroxide und Hydroxyl-Radikale zu generieren. Dies hat die Zerstörung der Lipidmembran und anderer zellulärer Komponenten zur Folge. Daher entwickelten lebende Organismen das Ferritin, das in der Lage ist Eisen in einer nicht-toxischen Form zu speichern und bei Bedarf wieder frei zu setzen [54]. Es wird vermutet, dass Ferritine ihren Ursprung in sehr einfachen Rubrerythrin-ähnlichen Molekülen haben, die eine Rolle in der Abwehr toxischer Sauerstoffspezies spielen [53]. Daraus entwickelten sich drei Gruppen der Ferritine [53]: die klassischen Ferritine in den Eukaryoten und manchen Bakterien, die Bakterioferritine und die Miniferritine (Abbildung 2.4).

Die klassischen Ferritine in Eukaryoten bestehen aus 24 Untereinheiten, die zusammen zu einer Proteinkugel aufgebaut sind, deren äußerer und innerer Durchmesser 12 nm bzw. 8 nm beträgt. Der Hohlraum, in dem sich der Eisenkern befindet, macht etwa 30 % des gesamten Proteinvolumens aus [8]. Das Ferritin besitzt die Kapazität bis zu 4500 Eisenionen zu speichern [55].

Einige Bakterien und Archaeen besitzen das Bakterioferritin, das ebenso aus 24 Untereinheiten aufgebaut ist. Das Bakterioferritin unterscheidet sich aber vom klassischen Ferritin darin, dass zwölf Hämgruppen zwischen den Untereinheiten eingebaut sind, deren Funktion vermutlich der Elektronentransport von dem Bakterioferritin-assoziierten Ferredoxin zum Bakterioferritin-Kern ist, um dort mineralisiertes Eisen freizusetzen [56].

Das Miniferritin oder Dps-Protein (Dps, aus dem engl. *DNA binding proteins from starved cells* = DNA-bindendes Protein in verhungerten Zellen), das in vielen Bakterien oder in manchen Archaeen zu finden ist, wird vor allem in der stationären Phase exprimiert [57] und hat die Hauptaufgabe die DNA vor oxidativem Stress zu schützen [58]. Sein Aufbau ist analog zum klassischen Ferritin, nur besitzt es 12 Untereinheiten, deren Proteinkugel einen äußeren und inneren Durchmesser von 9 nm bzw. 5 nm hat. In seinem Hohlraum können bis zu etwa 500 Eisenionen aufgenommen werden [59].

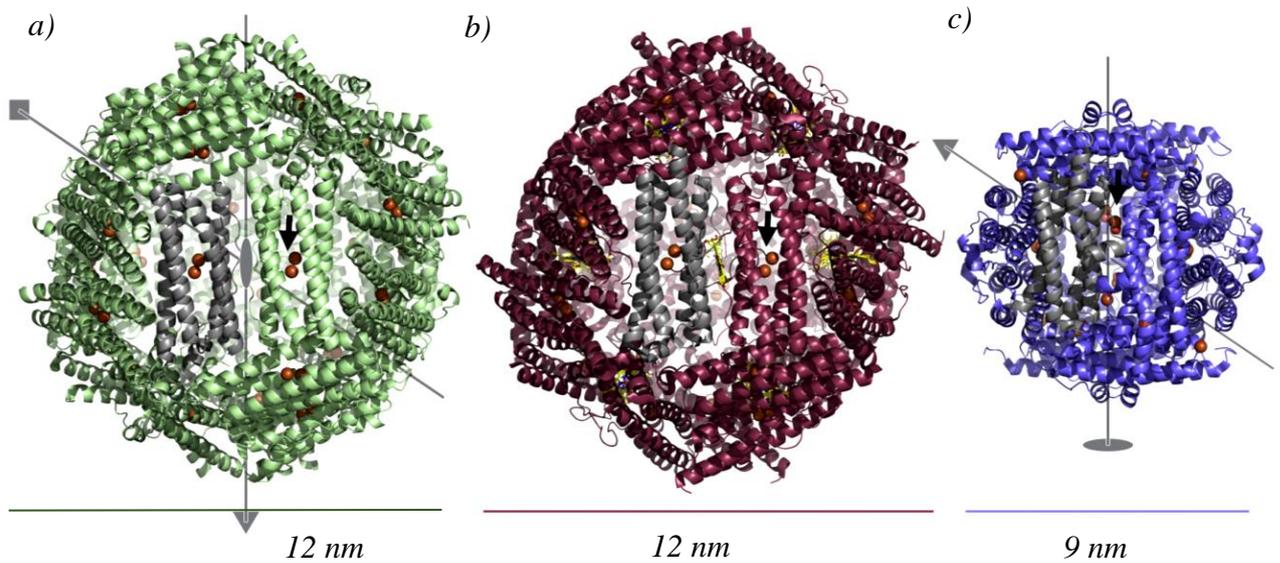


Abbildung 2.4: Die Proteinstruktur der drei Ferritin-Klassen: Klassisches Ferritin, das aus 24 Untereinheiten zu einer kugelförmigen Proteinkugel zusammengelagert ist (a); das Bakterioferritin, das ebenfalls aus 24 Untereinheiten besteht und zusätzlich Hämgruppen (gelb) besitzt (b); das Mini- oder Dps-Ferritin, das aus 12 Untereinheiten besteht (c). Die braunen Kugeln (markiert mit einem Pfeil) repräsentieren die Ferroxidasezentren (FOC). Aus He et al., 2015 [7].

2.2.2 SCHEMATISCHER AUFBAU VON APOFERRITIN

Der strukturelle Aufbau von Apoferritin ist bereits von vielen Wissenschaftlern genau studiert [8, 39, 60]. Apoferritin ist die Bezeichnung für die Proteinschale, anders ausgedrückt, für das Ferritin ohne den Eisenkern. Gegenwärtig existieren in der RCSB Protein-Datenbank 1777 Strukturen von 24-Untereinheit-Ferritinen, 48 Strukturen von 24-Untereinheit-Bakterioferritinen und 6 Strukturen von 12 Untereinheit-Miniferritinen [8].

Der vorliegende Abschnitt fokussiert sich auf den schematischen Aufbau des klassischen Apoferritins in Eukaryoten. Wie bereits erwähnt, ist das kugelförmige Apoferritin aus 24 Untereinheiten aufgebaut, deren Krümmung einen großen Hohlraum in der Proteinkugel ermöglicht [8]. Der äußere und innere Durchmesser der Proteinschale entspricht 12 nm bzw. 8 nm. Unbeladen besitzt Apoferritin eine Masse von etwa 450 kDa [61]. Das vollständige Gewicht variiert mit dem Eisenanteil im Hohlraum. In der Regel ist Ferritin nur partiell mit Eisen beladen. Dennoch besitzt es die Kapazität, bis zu 4500 Eisenatome aufzunehmen, und bringt im vollen Zustand ein Gewicht bis ca. 900 kDa zustande [61]. Eine schematische Darstellung der Untereinheiten sowie deren Assemblierung befindet sich in Abbildung 2.5.

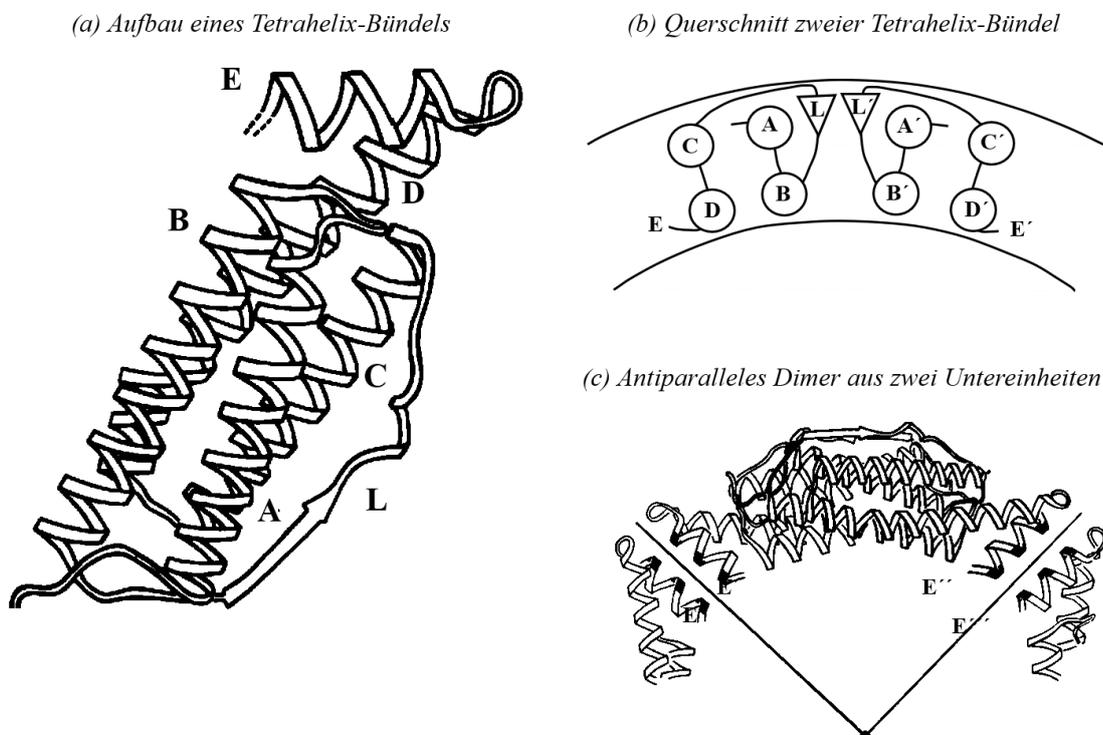


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung einer Untereinheit: vier lange Aminosäureketten (A-D) und eine kurze (E) sind zu einem Tetrahelix-Bündel zusammengefaltet (a); der Querschnitt zweier Untereinheiten (Dimer) zeigt die Anordnung der einzelnen α -Helices (b); der Zusammenhalt der Untereinheitsdimere erfolgt über die hydrophoben Wechselwirkungen der α -Helices E (c). Aus Ford et al., 1984 [6].

Die einzelnen Untereinheiten der drei Ferritingruppen liegen in der Form von Tetrahelix-Bündeln vor [53]. Ihre Aminosäuresequenz (Primärstruktur) kann zwischen den drei Arten der Ferritinproteine variieren. Die Sequenzdivergenz zwischen bakteriellem und eukaryotischem Ferritin liegt bei ca. 80 %. Unter all den eukaryotischen Ferritinen liegt die Divergenz im Mittel bei 30 – 40 % [8]. Die Sekundärstruktur der Tetrahelix-Bündel-

Untereinheiten ist zu 80 % aus α -Helices aufgebaut [8]. Wie in Abbildung 2.5 a dargestellt, faltet sich die Aminosäuresequenz zu einem Hauptbündel von vier langen α -Helices (A-D) und einer fünften kurzen α -Helix (E) senkrecht zum Hauptbündel zusammen (Sekundärstruktur). Der Zusammenhalt des Bündels erfolgt über intramolekulare Kräfte. Zusätzlich verbindet eine Schleife (L) das C-Terminal der α -Helix B und das N-Terminal der α -Helix C (Tertiärstruktur) [6].

Die Untereinheiten assemblieren spontan zu einer symmetrischen kugelförmigen Proteinschale in einer oktaedrischen 432-Symmetrie [39]. Zwei Untereinheiten ordnen sich antiparallel zu einem Dimer entlang der 2-fachen Symmetrieachse an, dessen Zusammenhalt über die hydrophoben Aminosäurereste der α -Helix A und die Schleife L mit der α -Helix A' sowie die Schleife L' der zweiten Untereinheit erfolgt (Abbildung 2.5 b und c) [62]. Die Vereinigung der Dimere zur Proteinkugel geschieht über die hydrophoben Wechselwirkungen der Aminosäureseitenketten der α -Helix E, wie in Abbildung 2.5 c gezeigt [39, 62].

An den 3-fachen und 4-fachen Symmetrieachsen bilden sich Kanäle, die die Proteinhülle durchqueren (Abbildung 2.6 a und b). Acht Kanäle bilden sich entlang den 3-fachen Symmetrieachsen, sechs Kanäle entlang den 4-fachen Symmetrieachsen [39]. Die Funktion und der Aufbau der Kanäle unterscheidet sich in ihrem Innenausbau hinsichtlich der Hydrophilie/Hydrophobie und der elektrischen Ladungsverteilung [63].

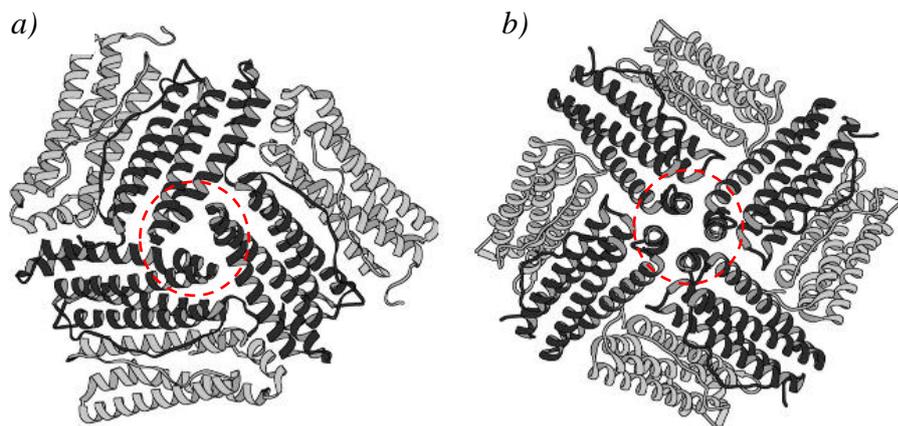


Abbildung 2.6: Oberflächenansicht der Kanäle an den 3-fachen (a) und 4-fachen (b) Symmetrieachsen. Aus Chandramouli et al., 2016 [63].

Der Innenausbau der acht Kanäle an den 3-fachen Symmetrieachsen ist bei höheren Ferritinen vorwiegend mit hydrophilen Aminosäureresten ausgekleidet. Ein Trimer der D-Helices formt diese Kanäle um die 3-fache Symmetrieachse durch das N-Terminalende der D-Helix und das C-Terminalende der C-Helix (Abbildung 2.6 a) [8, 63]. Diese Kanäle sind Uhrglas-förmig und besitzen eine Länge von etwa 15 Å [8, 63]. Im engsten Teil ist der Kanal bei Säugetieren und Pflanzen mit drei Aspartaten und drei Glutamaten ausgestattet. Diese Reste besitzen die Kapazität Metallionen zu binden. Damit werden diese Kanäle als die Ein- und Ausgangsroute für Fe^{2+} -Ionen vermutet [39].

Der Innenausbau der Kanäle an der 4-fachen Symmetrieachse ist stark hydrophob durch den hohen Anteil an Leucin-, Histidin- und Methioninresten [39]. Die Kanäle werden durch vier verlängerte Helixabschnitte E um die 4-fache Symmetrieachse gebildet und besitzen eine Länge von ca. 12 Å (Abbildung 2.6 b) [8, 63]. Die genaue Funktion der Kanäle an der 4-fachen Symmetrieachse ist noch nicht bekannt [8].

2.2.3 DIE EISENKERNBILDUNG

Während die Struktur der Proteinhülle des Apoferritins weitgehend im Detail aufgeklärt ist, ist der genaue Mechanismus der Eisenkernmineralisation an den Stellen der Keimbildung, ebenso der Einfluss der Aminosäuren auf die Fe^{2+} -Ionen-Aufnahme und auf das Kernwachstum, noch ungeklärt [40, 63].

Grob skizziert finden folgende Schritte bei der Eisenaufnahme und -abgabe statt: (1) Das Fe^{2+} -Ion wird vom Ferritin aufgenommen; (2) durch katalytische Redoxreaktion mit O_2 wird Fe^{2+} zu Fe^{3+} oxidiert; (3) die Oxidation führt zur Bildung von Fe^{3+}O -Monomeren, die sich zu einem Eisenkern zusammenbauen (Keimbildung und Kernwachstum); (4) durch Reduktion des Minerals erfolgt die Freigabe von Fe^{2+} aus dem Kern (Abbildung 2.7) [8].

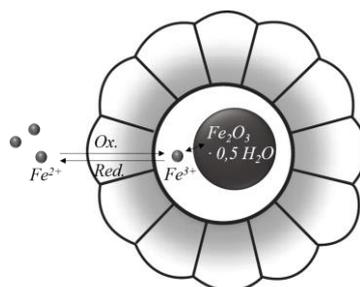


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung der Eisenaufnahme und -abgabe in Ferritin. Die Apoferritinstruktur wurde aus Fan et al., 2012, übernommen [55].

Die acht Kanäle um die 3-fache Symmetrieachse sind vermutlich die Verbindung der Fe^{2+} -Ionen von außen in den Kern. Die von den Aminosäuren (Asp und Glu) weitergeleiteten Fe^{2+} -Ionen werden zum aktiven Zentrum des Ferritins gebracht, das innerhalb der Tetrahelix-Bündel lokalisiert ist. Das aktive Zentrum, das dem Ferroxidasezentrum (FOC, engl. *ferroxidase center*) entspricht, hat die Aufgabe Fe^{2+} -Ionen in Gegenwart von Sauerstoff zu oxidieren und damit einen initialen Kern zu produzieren [54, 62]. Dieser Kern wird schlussendlich im Hohlraum gelagert. Röntgenbeugungsanalysen, Röntgenabsorption, elektronenmikroskopische Analysen und Dichtebestimmung des Eisenkerns haben ergeben, dass es sich hierbei um ein Ferrihydrit-ähnliches Mineral handelt [8].

Einfluss der L/H-Untereinheiten auf die Kernbildung

Ferritin ist aus zwei verschiedenen Typen der Untereinheiten aufgebaut, den H- und L-Untereinheiten (aus dem Engl.: *heavy* und *light*). Obwohl die Aminosäuresequenzen innerhalb der Untereinheiten nur zu 55 % identisch sind, sind sie zueinander isostrukturell. D.h., sie besitzen die gleiche Konformation und können sich beliebig über Wechselwirkungen zwischen identischen oder ähnlichen Aminosäureresten in H-H-, H-L- und L-L-Untereinheiten assemblieren [39, 54]. Ihr Kompositionsverhältnis ist abhängig von der Gewebeart. So enthalten Ferritine im Herzen und Gehirn etwa zwei Drittel H-Untereinheiten und ein Drittel L-Untereinheiten. Die Untereinheiten in der Leber und in der Milz bestehen zu 90 % aus L-Untereinheiten [62].

Der große Unterschied der beiden Untereinheiten ist, dass nur die H-Untereinheiten die FOC besitzen [62]. Diese FOC in den H-Untereinheiten katalysieren die Oxidation von Fe^{2+} -Ionen und produzieren damit Wasserstoffperoxid. Spektroskopische Studien haben gezeigt, dass sich ein di-Fe(III)peroxo-Intermediat am FOC bildet, das dann ein μ -oxo-Dimer bildet. Das Dimer fragmentiert letztendlich und migriert dann in das Nukleationszentrum, wo es aus den anfänglichen Mineralkernspezies den Kern bildet. Sobald sich der anfängliche Kern ausreichend gebildet hat, findet die Eisenoxidation und Mineralisation hauptsächlich auf der Oberfläche des wachsenden Kerns statt. Damit wird auch die Bildung des potenziell schädlichen Wasserstoffperoxids minimiert [62].

Die L-Untereinheiten besitzen im Gegensatz zu den H-Untereinheiten zusätzliche Glutamat-Reste, die eine Rolle in der Nukleation des Eisenkerns zu spielen scheinen und die als Cluster von vier Glutamatresten auf der inneren Oberfläche der Proteinschale die Nukleationszentren darstellen [40, 62]. Das einkommende Eisenion beginnt mit der

Kernbildung an diesen Zentren. Die initialen Eisenkerne vereinigen sich anschließend und bilden den finalen Kern.

Lopez et al. untersuchte das Eisenkernwachstum abhängig von der Rate der H/L-Untereinheiten und beobachtete aus rastertransmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen mit annularem Dunkelfeld-Detektor (HAADF-STEM), dass sich die Morphologie der Eisenkerne mit dem H/L-Untereinheiten-Verhältnis ändert [40]. Die Autoren schlussfolgerten, dass das Eisenkernwachstum durch Proteinsymmetrie und das H/L-Untereinheitenverhältnis kontrolliert wird. Steigt der Anteil an H-Untereinheiten, zeigt der Eisenkern eine geringere kubische Symmetrie [40]. Damit ist der Eisenkern im menschlichen Ferritin im Herzen, das überwiegend aus H-Untereinheiten aufgebaut ist, eher stäbchenförmig. Ferritine, die ausschließlich aus L-Untereinheiten bestehen, produzieren dagegen einen kugelförmigen und homogenen Eisenkern [40, 64]. Möglicherweise besitzen die H- und L-Untereinheiten komplementäre Funktionen. Da die H-Untereinheit die Katalyse (FOC) und Fe^{2+} -Aufnahme befördert, vermutet man, dass die Hauptfunktion dieser Untereinheit die Detoxifikation von Eisen ist. Die L-Untereinheit befördert primär die Eisenkernbildung und Kernwachstum und ist damit verantwortlich für die Eisenspeicherung [39, 40, 62].

2.2.4 MÖGLICHE ANWENDUNGSBEREICHE VON FERRITIN ALS BIOBASIERTES NANOPARTIKEL

Der Einsatz von Ferritin als biobasiertes Nanopartikel verspricht eine Reihe von Vorteilen gegenüber synthetisch hergestellten Nanopartikeln mit oder ohne entsprechender Oberflächenbeschichtung.

Durch ihren natürlichen Aufbau erfüllen Ferritine die Anforderung der Biokompatibilität und Bioabbaubarkeit. Das thermostabile Apoferritin fungiert als biologische Oberflächenschicht, die eine Koagulation der Nanopartikel verhindert. Zudem lässt sich Apoferritin für verschiedene Anwendungszwecke problemlos mit spezifischen Liganden funktionalisieren [65, 66].

Eine weitere besondere Fähigkeit dieses Proteins ist die Bildung von Nanopartikeln in seinem Hohlraum via Biomineralisation. Der Hohlraum von Apoferritin dient als Reaktionskammer für die Produktion von Nanopartikeln. Die negativen Ladungen zwischen den Untereinheiten erlauben den Ein- und Austritt der positiv geladenen Kationen während

der Mineralisation und Demineralisation [7]. Die Selektivität der Kanäle an den 3-fachen Symmetrieachsen ist sehr breit. Damit ist es möglich, dass eine große Anzahl an Metallionen wie Zinkselenid [67], Nickel [68] und Chrom [69] bevorzugt in divalenter Form *in vitro* mineralisiert werden können [59]. Auch einige monovalente und trivalente Metallionen werden toleriert [70].

Durch die gleichbleibende Größe des Apoferritins ist es auch als Templat für die Bildung monodisperser Nanopartikel geeignet. Dies ist eine wesentliche Voraussetzung für viele biologische und medizinische Prozesse und Anwendungen, da die chemischen und physikalischen Eigenschaften mit der Größe der Partikel variieren können [65, 66]. Zusätzlich kann das Apoferritin, neben der Funktion als Templat für die Nanopartikelsynthese, weitere Substanzen in den Hohlraum einlagern. So kann das Apoferritin nach Modifikation der Proteinschale mit entsprechenden Liganden als Transportgerüst für Therapeutika, wie z.B. Impfstoffe [71], eingesetzt werden [7]. Durch die geringe Größe von Ferritin (~ 12 nm) mit einem ca. 8 nm großen Eisenkern ist das Protein in der Lage durch das Gewebe zu diffundieren und schwer zugängliche Areale im Körper zu erreichen. So eignet es sich hervorragend als Kontrastmittel, da wie bereits erwähnt für MRT Eisenoxidpartikelgrößen von etwa 10 nm vorausgesetzt werden [32, 72].

Ein weiterer Vorteil von Ferritin hinsichtlich der Anwendung in der Medizin ist, dass es von dem RES-System, Kupffer-Zellen und Milzmakrophagen nicht erkannt wird. Es besteht somit die Möglichkeit das Immunsystem zu umgehen. Synthetische Nanopartikel werden teilweise sehr rasch von den Zellen des Abwehrsystems beseitigt und können somit ihre medizinische Funktion nicht erfüllen [73]. Zwar mag eine schnelle Elimination der Partikel bezüglich der Toxizität Vorteile haben, aber dies limitiert auch den Einsatz der Partikel für medizinische Zwecke, wo ihre verzögerte Elimination erwünscht ist. So ist z.B. für eine verbesserte magnetische Tumorerkennung die Modifikation künstlicher Eisennanopartikel mit PEG und Stärke nötig, um möglichst lange im Körper eingesetzt zu werden [74].

Schlussfolgernd lässt sich bestätigen, dass Ferritin als biobasierter Nanopartikel ein geeigneter Ersatz gegenüber synthetischen Nanopartikeln ist, da so einerseits die aufwändige Suche nach einer geeigneten Oberflächenbeschichtung von Nanopartikeln vermieden werden kann. Andererseits können monodisperse Nanopartikel erhalten werden. Zusätzlich stellt Ferritin ein geeignetes Transportvehikel für den Einsatz in schwer zugänglichen Arealen mit verlängertem Verbleib im Organismus dar.

2.2.5 MAGNETOFERRITIN

Die im Abschnitt 2.2.4 erwähnten vorteilhaften Eigenschaften von Ferritin erlauben seinen breiten Einsatz in den Bereichen der Bildgebung, Diagnostik und Therapie. Insbesondere als Kontrastmittel in Bildgebungsverfahren wie bei MRT wurde der Einsatz von Ferritin getestet [75, 76]. Nachteilig jedoch ist, dass das Signal bei natürlichem Ferritin sehr schwach ist [75]. Dies liegt daran, dass der Eisenkern von natürlichem Ferritin aus antiferromagnetischem Ferrihydrit besteht. Um das Signal zu erhöhen, wurde die Rekonstruktion von Ferritin zum sogenannten Magnetoferritin angestrebt, das durch die (Wieder-)Befüllung des Hohlraumes mit hoch magnetischen Eisenoxiden wie Magnetit oder Maghemit gekennzeichnet ist [5, 77]. Dabei sollen möglichst alle Ferrihydritanteile im natürlichen Eisenkern durch das superparamagnetische Magnetit (oder Maghemit) ausgetauscht werden, wie in Abbildung 2.8 schematisch gezeigt ist.

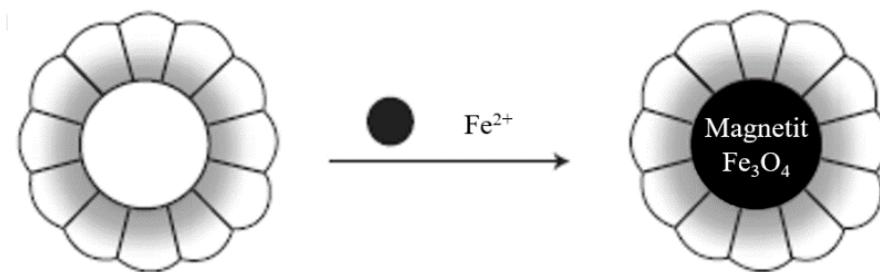


Abbildung 2.8: Bei der Synthese von Magnetoferritin wird durch schrittweise Addition von Fe^{2+} ein Magnetitkern inkorporiert. Aus Fan et al., 2012 [55].

Verschiedene Methoden zur Synthese von Magnetoferritin wurden bereits entwickelt. Seit 1992 wurden erste Versuche durchgeführt, mit Hilfe von Apoferritin zahlreiche Nanopartikel zu synthetisieren [78]. Die erste Füllung war hierbei das ferromagnetische Eisenoxid Maghemit (γ - Fe_2O_3), dessen Komposition namensgebend für Magnetoferritin war [77].

Die klassische Synthese von Magnetoferritin basiert auf der Beladung mit magnetischen Eisen(II)oxiden in natürlichem oder (semi-)genetisch modifiziertem Apoferritin [5, 78]. Jordan et al. entwickelte eine vereinfachte Synthese, für die kommerzielles Apoferritin aus der Pferdemicke verwendet wurde und in dessen Hohlraum durch schrittweise Addition und Inkorporation von Eisen(II)chlorid unter Sauerstoffausschluss der Magnetitkern gebildet

wird [5]. Uchida et al. verwendete für die Magnetoferritinsynthese genetisch hergestelltes rekombinantes menschliches Ferritin aus H-Untereinheiten [72].

Ein weiterer denkbarer Ansatz für eine Herstellung von Magnetoferritin ist die selbstständige oder induzierte Umwandlung des Eisenkerns von Ferrihydrit zu Magnetit. Dies ist inspiriert von der Biosynthese einiger Lebewesen wie der Käferschnecke *Acanthopleura hirtosa* oder magnetotaktischer Bakterien wie *Magnetospirillum magneticum*, die in der Lage sind, unter ambienten und wässrigen Bedingungen Magnetit-Kristalle mit sehr kontrollierten Größen und Formen aus Ferrihydrit zu bilden [79, 80]. Kernbildung und Wachstum werden dabei durch die Wechselwirkung des Minerals mit den biomolekularen Templats oder Zusätzen kontrolliert [79]. Magnetotaktische Bakterien bilden eine Kette von Magnetosomen, deren Funktion ähnlich einer Kompassnadel ist [11, 81]. Die Käferschnecke besitzt eine Reihe von Zähnen, wobei die jüngeren Zähne mit Ferrihydrit und die älteren Zähne mit Magnetit beschichtet sind. In diesem Fall besitzt Magnetit eine Stabilitätsfunktion [10, 82, 83]. Die Transformation von Ferrihydrit zu Magnetit in den magnetotaktischen Bakterien und an den Zähnen der Käferschnecke ist nicht geklärt. Man geht aber davon aus, dass eine Reduktion oder die Zugabe von Fe^{2+} -Ionen die Umwandlung von Ferrihydrit zu Magnetit bewirkt [79]. Das Wissen darüber, wie die Transformation von Ferrihydrit zu Magnetit geschieht und welche Faktoren diese auslösen, würde eine alternative Synthese von Ferritin zu Magnetoferritin versprechen. Dabei könnte die künstliche Synthese basierend auf der Entfernung des Kerns und Wiederbefüllung des Hohlraumes durch eine (selbst-)induzierte Reassemblierung des Ferritinkerns von Ferrihydrit zu Magnetit verdrängt werden.

2.3 RAMAN-ANALYSE DES EISENKERNS VON FERRITIN UND MAGNETOFERRITIN

2.3.1 PHYSIKALISCHE GRUNDLAGEN DER RAMAN-SPEKTROSKOPIE

Der Raman-Effekt definiert die inelastische Streuung von Licht an Molekülen bzw. Festkörpern. Die Existenz der inelastischen Streuung wurde erstmals 1923 von A. Smekal postuliert [84] und 1928 von den Physikern Sir C. V. Raman und K. S. Krishnan nachgewiesen [85]. Sir C. V. Raman erhielt 1930 für die „Arbeiten über die Streuung des Lichtes und die Entdeckung des nach ihm benannten Effekts“ den Nobelpreis für Physik [86].

Die inelastische Streuung ist ein Teil eines Emissionsvorganges, der nach Anregung der Moleküle entsteht. Wenn Licht mit der Materie wechselwirkt, kann Licht reflektiert, absorbiert oder gestreut werden. Von einer Absorption spricht man, wenn die Energie des Photons der Energiedifferenz zwischen dem Grundzustand und einem angeregten Schwingungszustand eines Moleküls entspricht. Von einer Streuung spricht man, wenn Teile des eingestrahnten Lichts der Energie $h\nu$ nach Interaktion mit einem Molekül oder Atom abgelenkt werden. Dies führt zu einer Anhebung des Moleküls in einen höheren Energiezustand, der auch virtueller Zustand genannt wird. Dieser virtuelle Zustand kann einen beliebigen Platz zwischen dem Grundzustand und dem ersten elektronischen Zustand einnehmen und ist abhängig von der Energie des eingestrahnten Laserlichts sowie den elektronischen Eigenschaften des Moleküls. Da der virtuelle Zustand sehr instabil ist, wird das eingestrahlte Licht sofort in alle Richtungen als Streustrahlung emittiert [87].

Die häufigste Streuform ist die Rayleigh-Strahlung (eines von $10^3 - 10^4$ Photonen), die nach Anregung des Moleküls mit der Energie $h\nu$ sofort wieder in den Grundzustand zurück geht. Dabei relaxiert die Elektronenwolke ohne nukleare Bewegung, d.h. die Energie des Moleküls ändert sich nicht. Da die Strahlung als Streustrahlung bei der gleichen Frequenz wie die des einfallenden Lichtes abgegeben wird, spricht man von einer elastischen Streuung.

Die weitaus seltener auftretende Raman-Streuung (eines von $10^6 - 10^8$ Photonen) ist dagegen die inelastische Streuung, bei der die Frequenz der Streustrahlung gegenüber der Frequenz des einfallenden Lichtes verschoben ist. Anders als bei der Rayleigh-Streuung beginnen die Kerne zu schwingen, wenn das Licht mit der Elektronenwolke der Moleküle interagiert. Die Energie des Moleküls ändert sich hierbei. Die Raman-Spektroskopie detektiert somit die Änderung der Schwingungsenergie eines Moleküls oder Kristallgitters. Die verschobenen Frequenzen des Streulichtes sind nach dessen Zerlegung als Spektrallinien im Spektrum ersichtlich. Dabei unterscheidet man zwischen den Stokes- und Anti-Stokes-Linien.

Die Stokes-Linien entstehen, wenn das vom Grundzustand angeregte Molekül nicht wieder in den Grundzustand zurückfällt, sondern in den ersten angeregten Schwingungszustand.

Die Energie der gestreuten Photonen ist um die Energie des Übergangs $\nu = 0$ nach $\nu = 1$ gemäß Gleichung 2.3 – 1 vermindert:

$$h\nu_{Stokes} = h\nu_0 - h\nu_{vib} \quad (2.3 - 1)$$

Befindet sich das Molekül bereits im angeregten Zustand und fällt in den Grundzustand zurück, spricht man von Anti-Stokes-Streuung. Das gestreute Photon hat eine um die Übergangsenergie $\nu = 0$ nach $\nu = 1$ erhöhte Energie, wie anhand Gleichung 2.3 – 2 hergeleitet werden kann:

$$h\nu_{\text{Anti-Stokes}} = h\nu_0 + h\nu_{\text{vib}} \quad (2.3 - 2)$$

Das Intensitätsverhältnis der Stokes- und Anti-Stokes-Strahlung hängt von der Anzahl der Moleküle im Grundzustand und im ersten angeregten Schwingungszustand ab. In der Praxis werden allerdings die intensiveren Stokes-Übergänge gemessen, denn gemäß der Boltzmann-Verteilung befindet sich bei Raumtemperatur die Mehrheit der Moleküle im Grundzustand.

Die drei Arten der Streustrahlung werden in Abbildung 2.9 schematisch im Jablonski-Diagramm veranschaulicht [87, 88]:

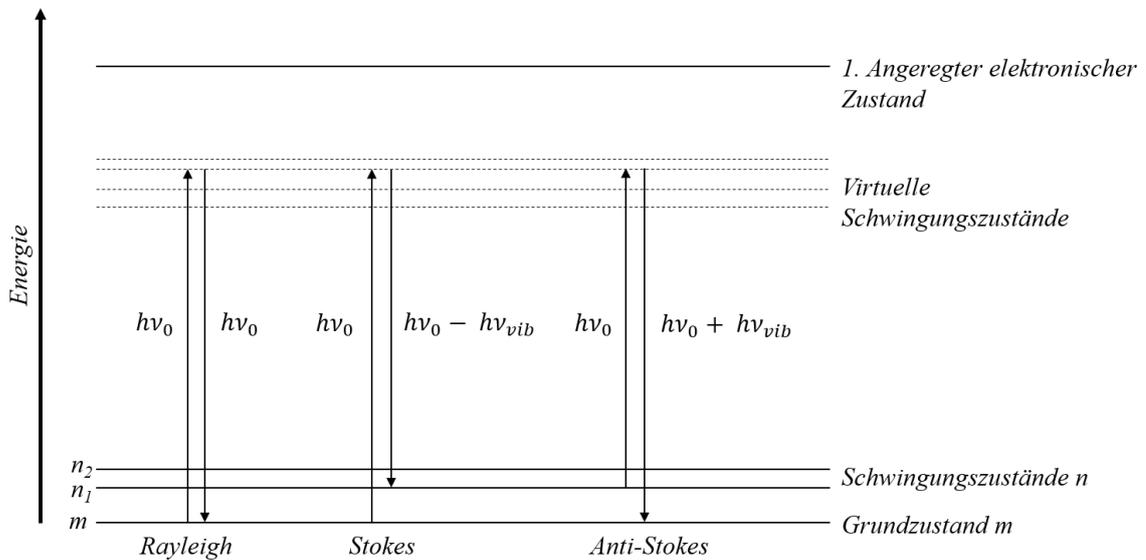


Abbildung 2.9: Schematische Darstellung der Streuungsarten im Jablonski-Diagramm: Bei der Rayleigh-Streuung entspricht die einstrahlende Frequenz $h\nu_0$. Stokes-Strahlung hat eine um $h\nu_{\text{vib}}$ verminderte Energie gegenüber $h\nu_0$. Anti-Stokes-Strahlung besitzt eine um $h\nu_{\text{vib}}$ erhöhte Energie. Hergeleitet von Ferraro et al., 2003, und Riedel, 2004 [88, 89].

Die Raman-Spektroskopie ist somit eine schwingungsspektroskopische Methode, basierend auf der Änderung der Schwingungsenergie der Moleküle nach einem inelastischen Stoß. Die verschiedenen Arten von Schwingungen können Informationen über die Art des Moleküls liefern.

Jedes Atom im Molekül besitzt drei Raumkoordinaten, die unabhängig voneinander sind. Somit hat ein Molekül mit N Atomen $3N$ Freiheitsgrade. Drei Freiheitsgrade entfallen auf Translation in x -, y - und z - Richtung, drei weitere auf Rotationen [88]. Die Anzahl der Schwingungsfreiheitsgrade ist $n = 3N - 6$. Für lineare Moleküle entfällt der Rotationsfreiheitsgrad in Richtung der Molekülachse, somit ist die Anzahl der Schwingungsfreiheitsgrade $n = 3N - 5$. Die Gesamtbewegung eines schwingenden Moleküls ist daher eine Überlagerung von $3N - 6$ bzw. $3N - 5$ Normalschwingungen [88]. Man unterscheidet (Abbildung 2.10) [88]:

- Valenz- oder Streckschwingungen, bei denen sich die Bindungslängen im Molekül ändern.
- Deformationsschwingungen zeigen sich durch geänderte Bindungslängen, die Atomabstände bleiben jedoch konstant oder mindestens ein Atom schwingt aus der durch drei Nachbarn gebildeten Ebene.

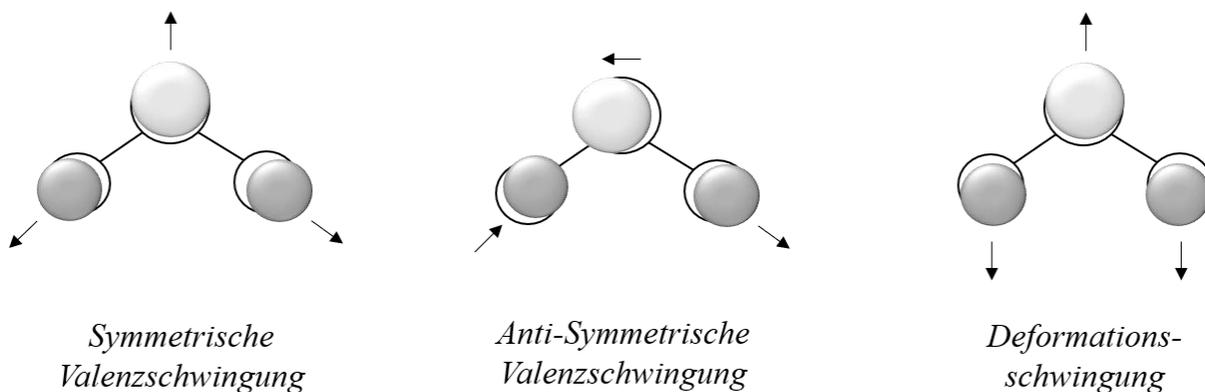


Abbildung 2.10: Die wichtigsten Schwingungsarten anhand des Wassermoleküls als Beispiel. Hergeleitet von Ferraro et al., 2003 [89].

Eine Molekülschwingung ist jedoch nur dann Raman-aktiv, wenn sich die Polarisierbarkeit der Elektronenwolke des Moleküls ändert. Quantenmechanisch lässt sich dies folgendermaßen erklären [87, 90]:

Monochromatisches Licht ist eine elektromagnetische Welle mit einem oszillierenden elektrischen Feld E der Frequenz ν_0 . Das elektrische Feld E wird mit folgender Formel 2.3 – 3 dargestellt:

$$E = E_0 \cos (2\pi\nu_0 t) \quad (2.3 - 3)$$

E_0 entspricht dabei der maximalen Schwingungsamplitude.

Die Polarisierbarkeit ist ein Maß für die Verschiebung der Elektronenwolke relativ zu den Kernen. Die Polarisation P wird durch das oszillierende elektrische Feld E des eingestrahlten Lichts induziert und ihre Stärke kann mit folgender Formel beschrieben werden. Mit der Polarisierbarkeit α und dem anfänglichen elektrischen Feld E gilt:

$$P = \alpha E \quad (2.3. - 4)$$

Setzt man Gleichung 2.3 – 3 in Gleichung 2.3 – 4 ein, erhält man:

$$P = \alpha E_0 \cos (2\pi\nu_0 t) \quad (2.3 - 5)$$

Durch die Polarisation wird das Molekül in Schwingungen versetzt. Schwingende Moleküle oszillieren mit ihren eigenen charakteristischen Frequenzen. Die molekularen Schwingungen mit $3N - 6$ bzw. $3N - 5$ Schwingungsmöglichkeiten in einem Molekül mit N Atomen werden als Normalschwingungen Q_j betrachtet. ν_j ist die entsprechende Frequenz der j -ten Schwingung. Q_j^0 stellt die maximale Schwingungsamplitude dar:

$$Q_j = Q_j^0 \cos (2\pi\nu_j t) \quad (2.3 - 6)$$

Die Polarisierbarkeit α kann für jede kleine Schwingung mathematisch in einer Taylorreihe genähert werden. α_0 ist die Polarisierbarkeit im Gleichgewichtszustand. Daraus folgt:

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\delta\alpha}{\delta Q_j} \right) Q_j + \dots \quad (2.3 - 7)$$

Durch die Vereinigung der Gleichungen 2.3 – 5 und 2.3 – 6 in die Gleichung 2.3 – 7 erhält man unter Vernachlässigung der höheren Terme die Gleichung 2.3 – 8:

$$P = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \left(\frac{\delta\alpha}{\delta Q_j}\right) Q_j^0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \cos(2\pi\nu_j t) \quad (2.3 - 8)$$

Mit $\cos(a) \cdot \cos(b) = \frac{\cos(a-b) + \cos(a+b)}{2}$ gilt schließlich:

$$P = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + E_0 Q_j \left(\frac{\delta\alpha}{\delta Q_j}\right) \frac{\cos[2\pi(\nu_0 - \nu_j)t] + \cos[2\pi(\nu_0 + \nu_j)t]}{2} \quad (2.3 - 9)$$

$$= \underbrace{\alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t)}_{\text{Rayleigh-Strahlung}} + \underbrace{\frac{1}{2} E_0 Q_j \left(\frac{\delta\alpha}{\delta Q_j}\right) \cos[2\pi(\nu_0 - \nu_j)t]}_{\text{Stokes-Strahlung}} + \underbrace{\frac{1}{2} E_0 Q_j \left(\frac{\delta\alpha}{\delta Q_j}\right) \cos[2\pi(\nu_0 + \nu_j)t]}_{\text{Anti-Stokes-Strahlung}}$$

Rayleigh-Strahlung

Stokes-Strahlung

Anti-Stokes-Strahlung

Anhand der Gleichung kann gezeigt werden, dass Licht in drei Frequenzen gestreut wird. Der erste Term stellt die Rayleigh-Streuung dar, deren Frequenz der des eingestrahlt Lichts entspricht.

Der zweite Term ist die Raman-Streuung bestehend aus Stokes ($\nu_0 - \nu_j$) und Anti-Stokes ($\nu_0 + \nu_j$). Hier ist ersichtlich, dass nur Schwingungen, die die Polarisierbarkeit ändern, Raman Streuung hervorbringen, da $\frac{\delta\alpha}{\delta Q_j} \neq 0$ sein muss [90]. Bei Molekülen mit einem

Symmetriezentrum gilt das Alternativverbot: Totalsymmetrische Schwingungen sind Raman-aktiv und IR-inaktiv; antisymmetrische Schwingungen rufen keine Änderung der Polarisierbarkeit hervor, und sind folglich Raman-inaktiv, dafür aber IR-aktiv [88].

Die Intensität der Raman-Signale ist somit abhängig von der Polarisierbarkeit der Elektronenwolke α_0 und der Energie der Anregungsquelle E_0 . Ebenso ist sie von der Masse der Atome, der Bindungsstärke sowie der Struktur der Moleküle abhängig. Laut Hook'scher Regel liefern starke Bindungen und leichte Atome höhere Schwingungsfrequenzen und schwache Bindungen und schwere Atome niedrigere Frequenzen [87, 90].

2.3.2 ALLGEMEINER AUFBAU EINES RAMAN-SPEKTROMETERS

Raman-Spektroskopie ist eine hochempfindliche Methode, die eine genaue Aufklärung der Struktur und chemischen Zusammensetzung einer Probe aufgrund der generierten „fingerprint“-Spektren erlaubt [91].

Der grobe Aufbau eines Raman-Spektrometers besteht aus einer Anregungsquelle, einem Photomultiplier/Spektrometer als Kollektor und einer CCD-Kamera (engl. *charge coupled device*) als Detektor [89]. Die Kombination der Raman-Spektroskopie mit einem integrierten optischen Mikroskop ist die Raman-Mikrospektroskopie. Vorteile liefert das Mikroskop durch die Detektion sehr kleiner Mengen des zu untersuchenden Materials. Sie erlaubt die chemische Analyse mit einer theoretischen Ortsauflösung im μm -Bereich. Zudem kann es die Fluoreszenz umgehen, indem ein ausgewählter Bereich bestrahlt wird, besonders wenn das Mikroskop konfokal eingebaut ist [87, 92]. Das Grundprinzip der Raman-Mikrospektroskopie wird in Abbildung 2.11 schematisch dargestellt.

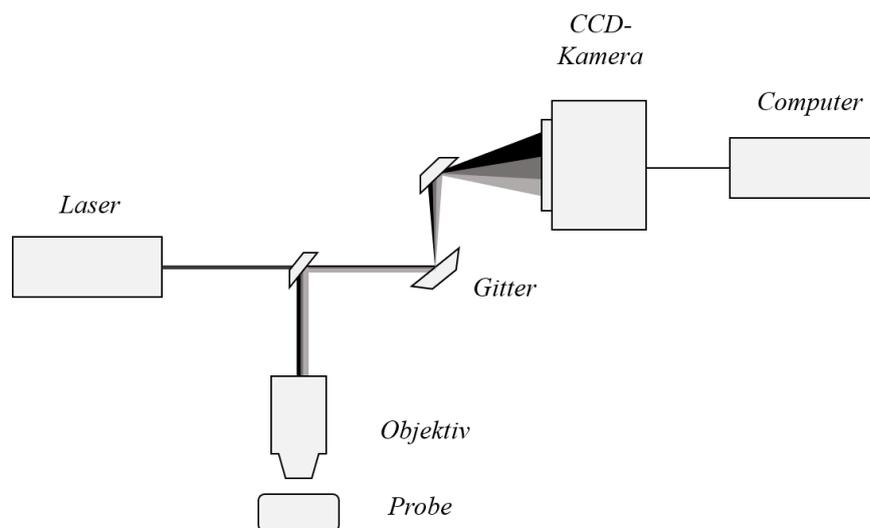


Abbildung 2.11: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips der Raman-Mikrospektroskopie.

In der Regel ist die Intensität der Raman-Streuung sehr gering, da sie sich antiproportional zur vierten Potenz der Anregungswellenlänge verhält ($I \sim \lambda^{-4}$) [90]. Daher ist die Anwendung intensitätsstarker und monochromatischer Anregungsquellen wie Laser sinnvoll. Um die gewünschte Wellenlänge für die Anregung zu erhalten und störende Hintergründe zu entfernen, wird das Laserlicht durch ein Linienfilter geleitet. Über einen Strahlteiler wird der Strahl abgelenkt und durch das Objektiv auf die Probe fokussiert. Die

von der Probe emittierte Rayleigh- und Raman-Strahlung passieren das Objektiv in umgekehrter Richtung und werden auf ein Kerb- oder Kantenfilter gelenkt. Mit Hilfe eines Kerb- oder Kantenfilters wird die Rayleigh- Strahlung herausgefiltert. Mit dem Kantenfilter kann zusätzlich auch die Anti-Stokes-Strahlung entfernt werden. Der Strahl wird durch ein Dispersionsgitter, das eine Monochromatorfunktion besitzt, in seine spektralen Bestandteile zerlegt. Diese werden schließlich von einer mittels Peltier-Element gekühlten CCD-Kamera detektiert.

2.3.3 EINSATZ DER RAMAN-MIKROSPEKTROSKOPIE FÜR DIE EISENKERN-ANALYSE VON FERRITIN UND MAGNETOFERRITIN

Die Raman-Spektroskopie hat viele Vorteile in der Analyse biologischer Substanzen wie z.B. Proteinen, Zellen und Biomolekülen [93]: (i) Die Raman-Spektroskopie liefert Spektren, die einzigartig für jede Struktur und chemische Komposition und damit auch für Konformationsänderungen (*fingerprint*) sind; (ii) Raman-Spektroskopie ist eine zerstörungsfreie Methode und hat eine Anwendungsbreite von kleinen löslichen Proteinen über großen Membranproteine bis hin zur Zellanalyse; (iii) die Technik ist unempfindlich gegenüber Wasser, da Wasser ein schwacher Raman-Streuer ist. Dies bietet die Gelegenheit, biologische Proben in Lösung oder in natürlicher Umgebung zu analysieren, die dabei ihre biologische Aktivität beibehalten; (iv) keine oder geringe Probenvorbereitung ist für eine Messung nötig.

Im Rahmen der Arbeit sollte die Eignung der Raman-Mikrospektroskopie für die Charakterisierung des Eisenkerns in Ferritin und Magnetoferritin untersucht werden. Mit dieser Methode wäre die Charakterisierung des Eisenkerns, ohne dabei die Proteinprobe zu zerstören, möglich. Eine Herausforderung der Raman-Analyse des Eisenkerns von Ferritin und Magnetoferritin könnte jedoch die Interpretation eines komplexen Raman-Spektrums mit vielen Banden, die von den Eisenverbindungen in Form von Eisenoxiden und -hydroxiden im Kern und von den biologischen Komponenten der Proteinschale stammen (Apo ferritin), sein. Die Raman-Analyse gliedert sich in zwei Teile: die Erkennung der Raman-Banden der jeweiligen Gruppe und die darauffolgende Interpretation der Banden.

Raman-Spektroskopie der Eisenoxide

Die Schwingungsmöglichkeiten im Kristallgitter werden als Phononen dargestellt. Phononen sind Quasiteilchen, deren Existenz in der Festkörperphysik angenommen wird, um die Eigenschaften der quantenmechanisch beschriebenen Gitterschwingungen in einem Kristall besser beschreiben zu können [94]. Wenn monochromatisches Licht (Photonen) mit den Phononen wechselwirkt, ist die Energie des gestreuten Lichts durch die inelastische Streuung verschoben. Diese Energieverschiebung lässt sich experimentell im Raman-Spektrum bestimmen. Da die Phononen für jedes Mineral spezifisch sind [95], können mittels Raman-Analyse die unterschiedlichen Strukturen und die chemische Zusammensetzung der verschiedenen Eisenoxide und -hydroxide unterschieden werden (Abbildung 2.12). Selbst eng verwandte Kristalle wie Goethit (α -FeOOH) und Lepidokrokit (γ -FeOOH) liefern unterscheidbare Raman-Signaturen, wie in Abbildung 2.12 ersichtlich ist.

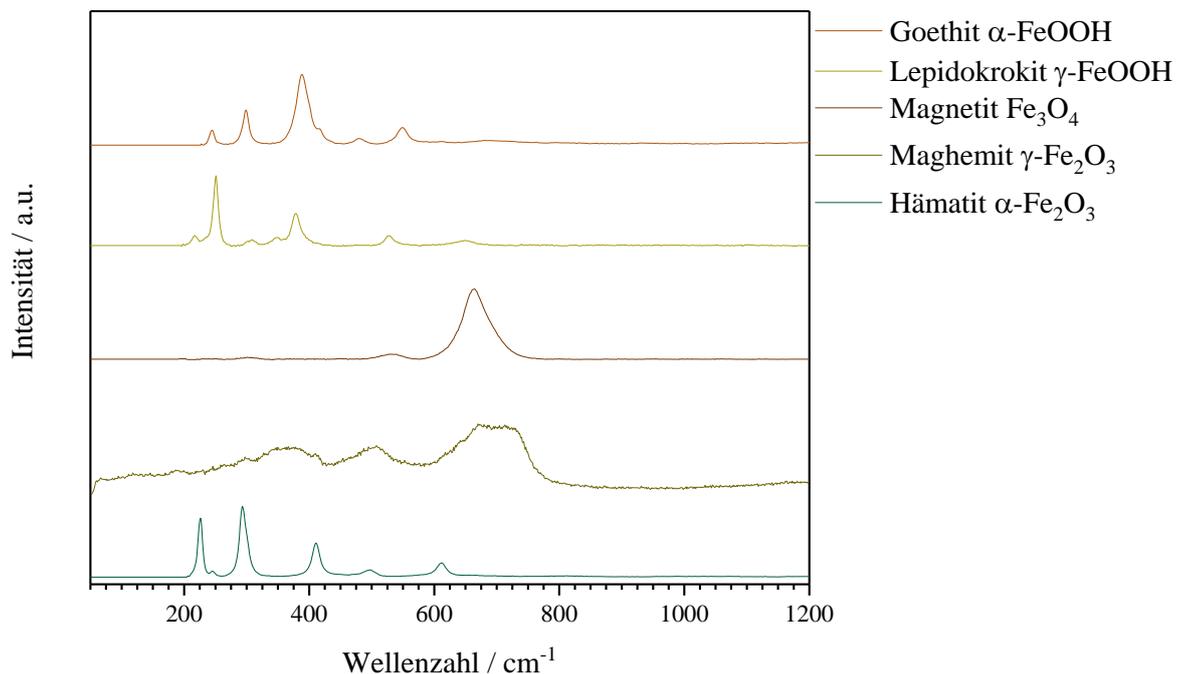


Abbildung 2.12: In Reihenfolge von oben nach unten sind die Raman-Signaturen von Goethit, Lepidokrokit, Magnetit, Maghemit und Hämatit gezeigt. Aus SpectralID 3.03 (Thermo Scientific, USA).

Am besten aufgeklärt sind Hämatit und Magnetit. Eine Einheitszelle des Hämatitkristalls (α -Fe₂O₃) gehört zu Raumgruppe D_{3d}^6 . Diese Gruppe sagt sieben theoretisch mögliche Raman-

aktive Schwingungszustände vorher: zwei symmetrische A_{1g} -Schwingungszustände bei 225 cm^{-1} und 498 cm^{-1} und fünf E_g -Schwingungszustände bei 247 cm^{-1} , 293 cm^{-1} , 299 cm^{-1} , 412 cm^{-1} und 613 cm^{-1} [20, 33].

Magnetit (Fe_3O_4) hat bei Raumtemperatur eine kubisch inverse Spinell-Struktur der Raumgruppe O_h^7 ($Fd3m$). Fünf Raman-aktive Schwingungszustände können erwartet werden: drei T_{2g} , eine E_g -Schwingung und eine A_{1g} -Schwingung [33, 96, 97]. Die stärkste Bande je nach Literatur bei 661 cm^{-1} [33] oder bei 670 cm^{-1} [97] kann der A_{1g} -Schwingung zugeordnet werden, die vermutlich durch Valenzschwingung der Sauerstoffverbindung mit den Eisenatomen in den A-Positionen verursacht wird [96, 97]. Die schwachen Banden bei 300 und 550 cm^{-1} stammen vermutlich von den T_{1g} -Schwingungen [20].

Maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) gehört zu Raumgruppe O_h^7 , das drei bekannte Raman-aktive Schwingungen bei 365 cm^{-1} (T_{2g}), 511 cm^{-1} (E_{1g}) und 700 cm^{-1} (A_{1g}) besitzt. Auffällig dabei ist das Verhältnis des A_{1g} -Peaks zu dem T_{2g} -Peak, das grob zwei entspricht [20].

Obwohl Eisenoxide und -hydroxide mittels Raman-Spektroskopie genau untersucht wurden [20, 33, 95, 97] und eine theoretisch mögliche Anzahl an Raman-aktiven Schwingungen vorhergesagt werden kann, herrscht immer noch Uneinigkeit in der Literatur. So sollten beispielsweise bei Magnetit fünf Raman-Banden im Spektrum ersichtlich sein. Allerdings wird von lediglich drei erkennbaren Banden bei 300 , 532 und 661 cm^{-1} berichtet [33]. Die nicht sichtbaren theoretisch vorausgesagten Raman-aktiven Banden sind vermutlich unkenntlich schwach.

Des Weiteren mangelt es bei einigen Eisenverbindungen wie Goethit ($\alpha\text{-FeOOH}$), Lepidokrokit ($\gamma\text{-FeOOH}$) und Ferrihydrit ($\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 0,5\text{ H}_2\text{O}$) noch an zuverlässigen Literaturquellen, da die Verbindungen nicht ausreichend zur Vorhersage theoretisch möglicher Raman-aktiver Schwingungen untersucht sind.

Außerdem sind durch Vergleich der Maxima der Bandenpositionen in cm^{-1} mehr oder weniger geringfügige Unterschiede der Bandenpositionen der jeweiligen Mineralien anhand diverser Literatur auffällig. In Tabelle 2.1 werden die Werte der Bandenpositionen zusammengefasst präsentiert. Einige Literaturquellen berichten sogar von zusätzlichen Banden. Mehrere Gründe können für das Auftreten dieser zusätzlichen Banden assoziiert werden. Entweder können diese vom Mineral stammen, sie können aber auch ihren Ursprung in Verunreinigungen haben. Des Weiteren können sie auch die Folge einer partiellen Umwandlung von einem Mineral zum anderen sein. Laserinduzierte Umwandlungen eines

Minerals sind ein sehr bekanntes Phänomen. Daraus resultiert ein Mischspektrum von Banden, die aus zwei oder mehreren Mineralien stammen.

Eine weitere Herausforderung in der Raman-Analyse der Eisenoxide und -hydroxide liefert die Kristallinitätsstufe des Minerals. Schwach kristalline Mineralien wie z.B. Ferrihydrit führen zu einer Verbreiterung der Banden, womit die genaue Identifizierung des Bandenursprungs erschwert wird.

Tabelle 2.1: Vergleich der Bandenpositionen von Hämatit, Magnetit, Maghemit, Ferrihydrit, Lepidokrokit, Goethit anhand verschiedener Literatur.

Substanz	Formel	Bandenpositionen in cm^{-1}	Literatur
Hämatit	$\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$	225, 247, 293, 412, 498, 613	De Faria et al., 1997 [33]
		229, 249, 295, 302, 414, 500, 615, 660	Jubb et al., 2010 [20]
		225, 245, 291, 411, 500, 611, 1321	Hanesch, 2009 [95]
Magnetit	Fe_3O_4	300, 532, 661	De Faria et al., 1997 [33]
		297, 535, 661	Brooker et al. 2006 [98]
		310, 554, 672	Jubb et al., 2010 [20]
		300, 532, 661	Hanesch, 2009 [95]
Maghemit	$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	350, 500, 700	De Faria et al., 1997 [33]
		365, 511, 700	Jubb et al., 2010 [20]
		350, 512, 664, 726	Hanesch, 2009 [95]
Ferrihydrit	$\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 0,5 \text{H}_2\text{O}$	347, 493, 692, 725	Hanesch, 2009 [95]
		370, 510, 710	Brooker et al. 2006 [98]
Lepidokrokit	$\gamma\text{-FeOOH}$	245, 373, 493, 522, 650, 719, 1303	De Faria et al., 1997 [33]
		214, 245, 301, 345, 373, 521, 644	Hanesch, 2009 [95]
		250, 348, 379, 528, 650	Brooker et al., 2006 [98]
Goethit	$\alpha\text{-FeOOH}$	243, 299, 385, 479, 550, 685, 993	De Faria et al., 1997 [33]
		244, 299, 385, 480, 548, 681	Hanesch, 2009 [95]

Raman-Spektroskopie von Proteinen

Proteine sind lange Polypeptide, aufgebaut aus hunderten von Aminosäuren. Das Resultat ist ein Komplex von überlappenden Banden im Raman-Schwingungsspektrum. Dennoch liefern einige Molekülgruppen, z.B. die Peptidbindung (Amidbindung) oder die aromatischen Aminosäuren wie Tryptophan (Trp), Tyrosin (Tyr) und Phenylalanin (Phe), ausgeprägte Banden, die sich für die Charakterisierung und Identifizierung von Proteinen eignen [99].

Bei der Konformation der Proteinsekundärstruktur kann zwischen α -Helix, β -Faltblatt (parallel und antiparallel) und zufällig angeordnet (engl. *random coil*) unterschieden werden. Aufschluss der Konformation der Sekundärstruktur kann durch die charakteristischen Amid-Banden gegeben werden. Neun Normalmoden resultieren von der Peptidbindung, die als Amid A (N-H-Streckschwingung, 3500 cm^{-1}), Amid B (N-H-Streckschwingung, 3100 cm^{-1}), und mit abnehmender Frequenz Amid I-VII (I: $1600 - 1690\text{ cm}^{-1}$, II: $1480 - 1580\text{ cm}^{-1}$; III: $1230 - 1300\text{ cm}^{-1}$; IV: $625 - 770\text{ cm}^{-1}$; V: $640 - 800\text{ cm}^{-1}$; VI: $540 - 600\text{ cm}^{-1}$ und VII: 200 cm^{-1}) bezeichnet werden [100]. Klar sichtbar im Raman-Spektrum sind allerdings lediglich die Amid I (C=O-Streckschwingung) und Amid III (gekoppelte C-N-Streckschwingung und N-H-Biegeschwingung) und somit auch relevant für die Bestimmung des Protein-Rückgrates mittels Raman-Spektroskopie [100, 101]. In Abbildung 2.13 werden diese Schwingungsarten veranschaulicht dargestellt.

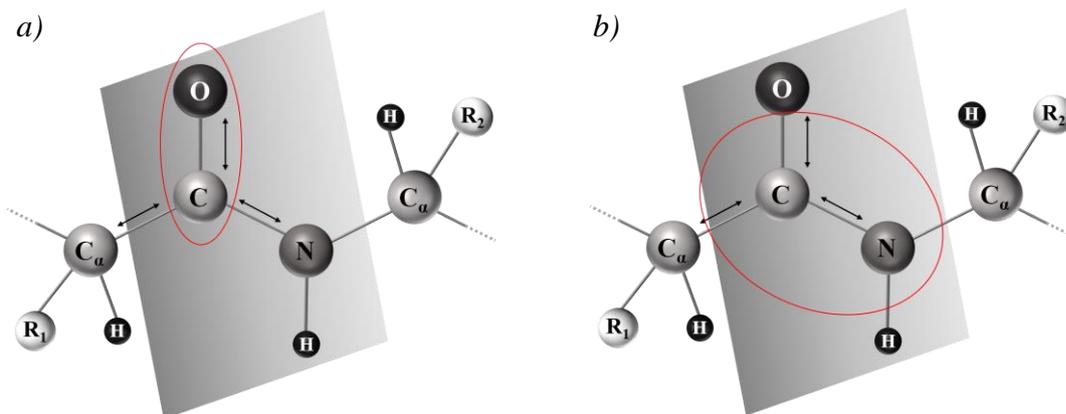


Abbildung 2.13: Schematische Darstellung der Amid I (a) und Amid III (b) Schwingungen [102]. Die Amid I-Bande wird durch die C=O-Streckschwingung (80 %) erzeugt. Die Amid III-Bande stammt von den C-N-Streckschwingungen (40 %) und N-H-Biegeschwingungen (30 %).

Die Peptidbindung fungiert innerhalb einer geordneten Sekundärstruktur als Akzeptor für Wasserstoffbrückenbindungen, was dazu führt, dass die Amid I-Bande stark abhängig von der Sekundärstruktur ist und intensivere Banden liefert [99]. So zeigt die α -Helix eine starke Bande bei $1650 - 1655\text{ cm}^{-1}$. Die Stärke der Wasserstoffbrückenbindungen im β -Faltblatt ist variabler, aufgrund der Flexibilität und Tendenz sich zu wenden. Eine starke Bande bei $1612 - 1640\text{ cm}^{-1}$ und schwache Bande bei $1670 - 1690\text{ cm}^{-1}$ sind typisch für β -Faltblattstrukturen. *Random Coil*-Strukturen haben ihre Raman-Verschiebung bei

1665 cm⁻¹ [101]. Im Gegensatz zu Amid I- geben Amid III-Banden schwächere Raman-Signale und ihre Bandenpositionen liegen im Raman-Spektrum in einem Bereich, wo weitere nicht der Amid III zugehörige Raman-Banden auftreten können. Für die klare Identifizierung der Sekundärstruktur sollte die Amid III-Bande stets zusammen mit der Amid I betrachtet werden [101]. In Tabelle 2.2 werden die verschiedenen Raman-Verschiebungen der Amid I und III aus unterschiedlicher Literatur verglichen.

Tabelle 2.2: Raman-Verschiebung in cm⁻¹ der Amid I- und Amid III-Bande, bezogen auf ihre Sekundärstruktur nach jeweiliger Literatur.

	Konformation	Raman-Verschiebung in cm ⁻¹		
		Pelton et al., 2000 [101]	Rygula et al., 2013 [100]	Kengne-Momo et al., 2012 [103]
Amid I	α-Helix	1650 – 1657	1662 – 1655	1659
	β-Faltblatt Antiparallel	1612 – 1640	1674 – 1672	1673
		1670 – 1690 (schwach)		
		1626 – 1640		
	β-Kehre	1655 – 1675		
	1680 – 1696			
	Random Coil	1640 – 1651		
Amid III	α-Helix		1272 – 1264	1336
	β-Faltblatt		1242 – 1227	1243

Da Ferritine hauptsächlich aus α-Helices aufgebaut sind, sind in dieser Arbeit deren charakteristische Raman-Banden interessant. Eine Bande bei 933 cm⁻¹ stammt von der Schaukelschwingung der CH₃-Gruppe am C-Terminal der α-Helices [103]. Charakteristisch für α-Helices ist auch die Bande bei 1345 cm⁻¹, die der C-C_α-H-Biegeschwingung und der C_α-C-Streckschwingung zugeordnet werden kann [100].

Aminosäureseitenketten, insbesondere aromatische, geben im Raman-Spektrum signifikante Signale. Im Folgenden werden die wichtigsten aufgelistet und eingehend erklärt.

Eine ausgeprägte Bande bei etwa 1000 cm⁻¹ stammt von der Ringatmung des Phenolrings (engl. *ring breathing mode*) des Phenylalanins. Diese Bande ist ein Marker für die Präsenz eines intakten Proteins [104].

Die Tyrosin-Fermi-Dublette mit Raman-Banden bei 830 cm⁻¹ und 850 cm⁻¹ stammt von der Wechselwirkung der Ringatmung in der Ebene (engl. *in-plane breathing mode*) des

Phenolrings und der Oberton-C-C-O-Deformationsschwingung im *para*-substituierten Benzolring aus der Ebene heraus (engl. *out-of-plane deformation mode*) [99]. Das Intensitätsverhältnis I_{850}/I_{830} der beiden Banden liefert einen Hinweis auf den Status der Wasserstoffbrückenbindung, an der die OH-Gruppe der Phenylseitenkette beteiligt ist [99]. Tryptophan ruft spezifische Banden bei 880 cm^{-1} , 1360 cm^{-1} und 1550 cm^{-1} hervor. Die Bande bei 880 cm^{-1} gibt Aufschluss über die Stärke der Wasserstoffbrückenbindung von NH des Indolrings. Je höher die Frequenz ist, desto stärker die Bindung. Die Bande bei 1550 cm^{-1} wird von der Orientierung des Indolrings zum C_{α} beeinflusst. Das Intensitätsverhältnis der Banden bei 1340 cm^{-1} und 1360 cm^{-1} die Tryptophan-Fermi-Dublette ist ein Marker für die Hydrophobie. Die Bande bei 1360 cm^{-1} ist sehr intensiv in hydrophoben Lösungsmitteln ($I_{1360}/I_{1340} > 1,1$), in hydrophilen dagegen ist die Bande bei 1340 cm^{-1} ($I_{1360}/I_{1340} < 0,9$) ausgeprägter [102].

Auch schwefelhaltige Aminosäuren wie Cystein liefern Signale im Raman-Spektrum. Die Raman-Banden der Disulfidbrückenbindungen (S-S) befinden sich im Wellenzahlbereich von $500 - 550\text{ cm}^{-1}$ [100]. Die Streckschwingungen der Sulfidgruppen (SH) im Cystein liefern Banden im Bereich $2500 - 2600\text{ cm}^{-1}$ [99]. Die C-S- Streckschwingung mit H in der *trans*-Position liefert Banden bei $640-680\text{ cm}^{-1}$, wohingegen ein C-Atom in der *trans*-Position Banden bei $740 - 760\text{ cm}^{-1}$ hervorruft [100].

Weitere sehr ausgeprägte Banden im Raman-Spektrum von Proteinen sind die C-H-Streckschwingungen der aliphatischen Seitenkette, die ein Raman-Signal bei $2860 - 2940\text{ cm}^{-1}$ liefern und die C-H-Deformationsschwingung, deren Raman-Verschiebung bei 1450 cm^{-1} liegt [103].

2.4 METHODEN FÜR DIE VALIDIERUNG DER RAMAN-ANALYSE

Mößbauer-Spektroskopie und Röntgenbeugungsanalyse (XRD, engl. *X-ray diffraction*) sind zwei unabhängige komplementäre Methoden, die die Validierung der Ergebnisse aus der Raman-Spektroskopie erlauben, da sie neben der Raman-Spektroskopie auch für die Bestimmung der Kristallstruktur von Eisenoxiden und -hydroxiden geeignet sind. Die Grundprinzipien der einzelnen Methoden werden in folgenden Abschnitten kurz erläutert, ebenso die Herangehensweisen an die Probenvorbereitungen für die jeweiligen Analysen.

2.4.1 MÖSSBAUER-SPEKTROSKOPIE

Die Mößbauer-Spektroskopie ist eine Methode zur Bestimmung der Struktur der Eisenkristalle. Dabei werden Kernresonanzphänomene, die sog. Mößbauer-Effekte, genutzt und auch der Doppler-Effekt. Entdeckt wurde der Mößbauer-Effekt von Rudolf Mößbauer im Jahre 1958 und definiert die rückstoßfreie Kernresonanz von γ -Strahlen durch die Atome [88]. Eine schematische Anschauung der rückstoßfreien Kernresonanz am Beispiel von ^{57}Fe befindet sich in Abbildung 2.14.

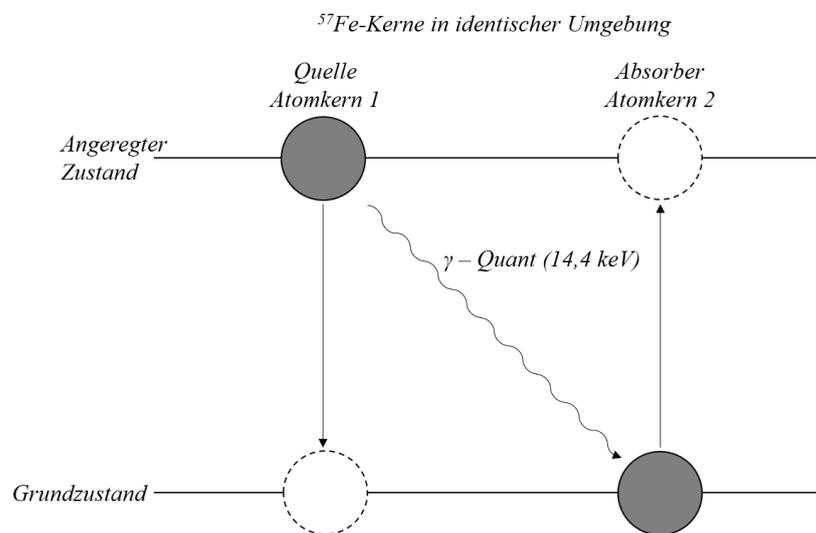
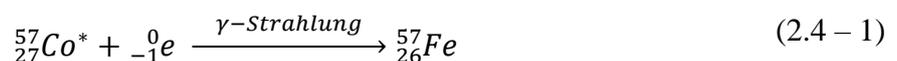


Abbildung 2.14: Schematische Darstellung der rückstoßfreien Kernresonanz von ^{57}Fe . Aus Riedel, 2004 [88].

Beim Übergang eines angeregten Kernzustands (Quelle) zum Grundzustand wird ein γ -Quant emittiert, das eine Energie von 14,4 keV besitzt. Dieses γ -Quant kann von einem gleichen Kern im Grundzustand (Absorber) absorbiert werden. Vorausgesetzt wird jedoch, dass die chemische Umgebung von Quelle und Absorber identisch ist. Die Anregung der Quelle erfolgt ebenfalls durch ein γ -Quant, das identisch zur Energiedifferenz zwischen dem Grundzustand und angeregtem Zustand des zu untersuchenden Atoms ist. Geeignete Anregungsquellen sind radioaktive Substanzen, die durch Zerfall die gewünschte Energie der γ -Quanten generieren. Als geeignete Anregungsquelle für ^{57}Fe kommt ^{57}Co infrage, das durch Elektroneneinfang das γ -Quant für die Anregung von ^{57}Fe emittiert (2.4 – 1).



Ist die Energiedifferenz zwischen dem Grundzustand und dem angeregten Zustand für Quelle und Absorber nicht genau gleich, erfolgt keine Resonanz. Jedoch kann eine Resonanzbedingung durch Modulation der Energie des γ -Quants nach Zuführung von Dopplerenergie hergestellt werden. Diese wird durch mechanische Bewegung der Quelle erzeugt (Doppler-Effekt). Bei der ^{57}Fe -Mößbauerspektroskopie wird die Quelle mit einer Geschwindigkeit von -10 mm/s und $+10\text{ mm/s}$ hin und her bewegt. Pro mm/s erhält das γ -Quant eine zusätzliche Energie von $5 \cdot 10^{-8}\text{ eV}$ [88]. Durch Messung der Kernresonanz in Abhängigkeit von der Quellengeschwindigkeit erhält man ein Mößbauerspektrum. Die modulierte γ -Strahlung durchdringt die Probe und einige Atomkerne der Probe absorbieren diese. Die Schwächung der Strahlungsintensität der Quelle wird mit einem Detektor registriert und man erhält ein Transmissionsspektrum (Abbildung 2.15).

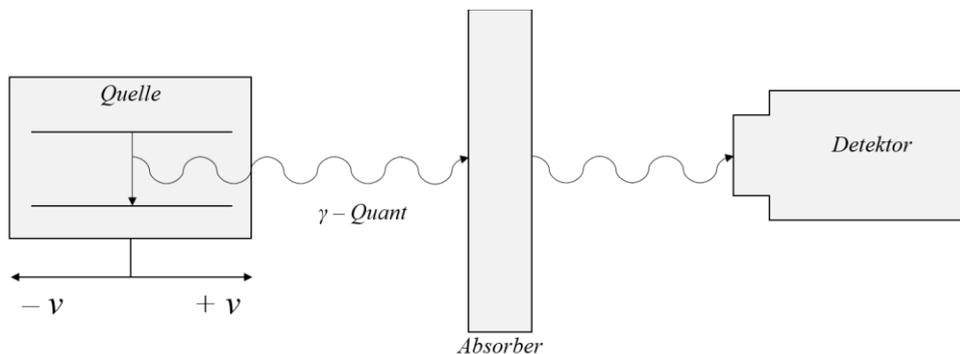


Abbildung 2.15: Die Probe enthält Kerne desselben Isotops wie die der Quelle. Die von der Quelle emittierten γ -Quanten werden dann von den Kernen der Probe absorbiert. Die Absorption der γ -Quanten wird vom Detektor als Schwächung der Strahlungsintensität der Quelle registriert. Hergeleitet aus Riedel, 2004 [88].

Aus der von Elektronen-Kern-Wechselwirkungen resultierenden hochaufgelösten Hyperfeinstruktur (Energieaufspaltung der Spektrallinien im Atomspektrum) können Rückschlüsse auf die Kerne und auch auf die Eigenschaften ihrer elektronischen Umgebung, wie z.B. Oxidationszustand oder magnetisches Verhalten, gezogen werden.

Drei Arten der hochauflösenden Hyperfeinstruktur können in einem ^{57}Fe -Mößbauerspektrum erwartet werden [88]. Diese äußern sich als:

- Isomerieverschiebung δ , die durch die Wechselwirkung zwischen dem Kern und den umliegenden Elektronen zustande kommt und damit eine Verschiebung des Energieniveaus bewirkt. Dadurch können Aussagen über Oxidationszustand, Koordination, Elektronennegativität von Liganden und π -Akzeptoreigenschaften

von Liganden in Komplexen getroffen werden. Im Mößbauer-Spektrum von ^{57}Fe erscheint ein Singulett.

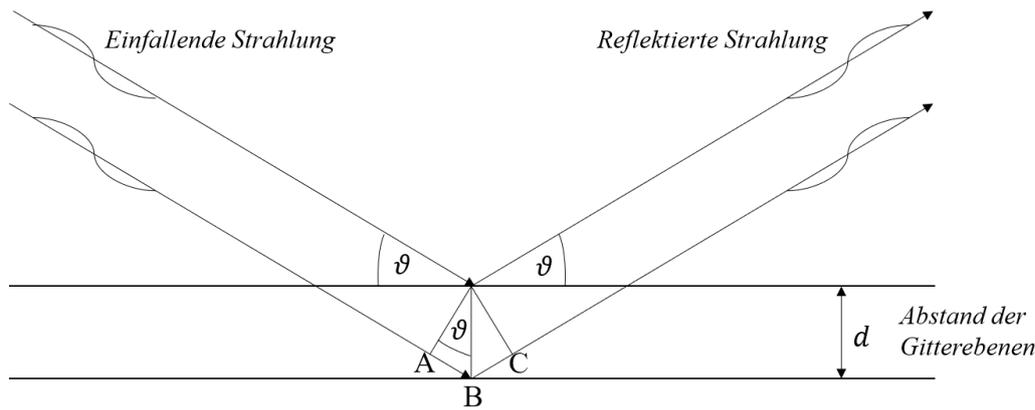
- Die elektrische Quadrupolaufspaltung Δ , die aus der Wechselwirkung zwischen dem elektrischen Quadrupolmoment des Kerns und einem inhomogenen elektrischen Feld am Kernort (Ladungsverteilung) resultiert. Man erhält daraus Informationen über die Molekül- und Platzsymmetrie, Oxidationszustand, Koordination und Ligandenfeldaufspaltung. Im Mößbauer-Spektrum von ^{57}Fe erscheint eine Dublett.
- Die magnetische Hyperfeinaufspaltung ΔE_M entsteht durch Wechselwirkung zwischen dem magnetischen Dipolmoment eines Kerns mit einem magnetischen Feld am Kernort. Diese liefert Informationen über den magnetischen Zustand und Stärke innerer Magnetfelder. Im Mößbauer-Spektrum von ^{57}Fe erscheint ein Sextett.

2.4.2 RÖNTGENBEUGUNG (XRD)

Bei der Röntgenbeugung (XRD, engl. *X-ray diffraction*) wird die Kristallstruktur durch die Beugung der Röntgenstrahlung am Kristallgitter ermittelt.

In der Röntgenröhre wird durch schnelle Ionisation kernnaher Elektronen Röntgenstrahlung emittiert. Diese trifft auf den Kristall mit einem Winkel ϑ . Die Beugung von Röntgenstrahlen an den Beugungszentren im Gitter führt zu einer Reflexion der Röntgenstrahlen an aufeinanderfolgenden Gitterebenen im Kristall. Treffen die Röntgenstrahlen unter einem Einfallswinkel ϑ auf den Kristall, dann kann eine Reflexion unter demselben Austrittswinkel erfolgen, wenn die Gleichung von Bragg erfüllt wird. In Abbildung 2.16 wird die Bragg-Gleichung, die die Bedingungen für eine konstruktive Interferenz beschreibt, schematisch dargestellt.

λ ist die Wellenlänge des eingestrahnten monochromatischen Lichtes, d ist der Abstand der Gitterebenen, ϑ der Winkel, unter dem die Strahlung auf die Gitterebene trifft. $2d\sin\vartheta$ gibt den Gangunterschied zweier an zwei Gitterebenen mit Abstand d gebeugten Röntgenstrahlen an. Dieser Abstand d muss ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge betragen, sonst erfolgt die Auslöschung der Strahlung durch Interferenz. Die Gleichung 2.4 – 2 definierten William Henry Bragg und William Lawrence Bragg als „Reflexionsbedingungen“.



$$n\lambda = 2d\sin\vartheta \quad \text{für } n=1,2,3, \dots \quad (2.4 - 2)$$

Abbildung 2.16: Schematische Darstellung der Reflexion von Röntgenstrahlung an den Gitterebenen des Kristalls. $AB = BC = d\sin\vartheta$. Die Bedingung ist $n\lambda = 2d\sin\vartheta$, sonst erfolgt die Auslöschung durch Interferenz. Aus Riedel [88].

Wenn eine Schar paralleler Gitterebenen die Bragg-Gleichung erfüllt, überlagern sich die von den Einzelebenen reflektierten Wellen so, dass konstruktive Interferenz entsteht. Anders ausgedrückt, gibt es für jede Gitterebenschicht nur bestimmte Winkel, unter denen die Reflexion stattfindet (Bragg-Winkel). Die durch die konstruktive Interferenz entstandene Strahlung kann detektiert werden.

In Abbildung 2.17 ist das Funktionsprinzip der Röntgenbeugung gezeigt. In der Röntgenröhre wird Röntgenstrahlung erzeugt. Mit einer Blende (Kollimator) wird ein enger monochromatischer Röntgenstrahl ausgeblendet und auf den Kristall gerichtet, der drehbar gelagert ist. Der Kristall wirkt durch seine kleinen Atomabstände wie ein fein strukturiertes Beugungsgitter. Die entstehenden Interferenzmuster lassen sich rechenstechnisch auswerten und geben Auskunft über die räumliche Anordnung der Atome oder Ionen im Kristallgitter. Da die Röntgenstrahlung in alle Richtungen gebeugt werden kann, ist es sinnvoll die Probe während der Messung zu drehen. Immer wenn während der Drehung des Kristalls eine Ebenenschicht im Kristall die Bragg-Gleichung erfüllt, wird ein gebeugter Strahl aufleuchten, was im Detektor registriert wird (photographischer Film, Zählrohr, Bildplatte).

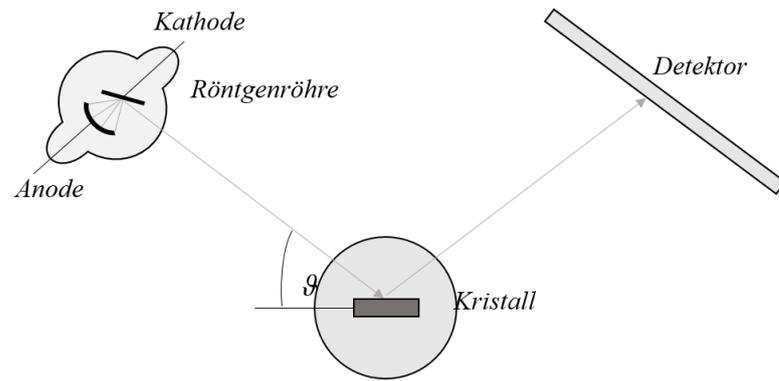


Abbildung 2.17: Schematische Darstellung der Röntgenbeugung: Dabei wird die Probe mit monochromatischer Röntgenstrahlung bestrahlt. Als Quelle wirkt eine Röntgenröhre, die durch schnelle Ionisation kernnaher Elektronen Röntgenstrahlung emittiert. An den Proben erfolgt die Beugung der Röntgenstrahlen und die Streustrahlung wird detektiert. Aus Mortimer, 2010 [105].

3 EXPERIMENTELLER TEIL

3.1 RAMAN-MIKROSPEKTROSKOPIE

Die in dieser Arbeit gezeigten Raman-Spektren wurden entweder auf einem Raman-Mikroskop *LabRAM HR* (*Horiba Scientific*, Frankreich) oder einem Raman-Mikroskop *alpha300R* (*WITec GmbH*, Deutschland) gemessen. Das allgemeine Funktionsprinzip der Raman-Spektroskopie wurde bereits im Kapitel der Theoretischen Grundlagen im Abschnitt 2.3 erläutert. Im Folgenden wird auf die Gerätespezifikationen näher eingegangen.



Abbildung 3.1: Bildliche Darstellung der Raman-Mikroskope *LabRAM Horiba HR* (links) und *alpha300R WITec* (rechts).

3.1.1 RAMAN-MIKROSKOP *LabRAM HR*

Das Raman-Mikroskop *LabRAM HR* mit integriertem BXF_M Mikroskop (*Olympus Co.*, Japan) ist mit drei Lasern ausgestattet. Die kürzeste Anregungswellenlänge λ_0 besitzt der frequenzverdoppelte Neodym-dotierte Yttrium-Aluminium-Granat-Laser (Nd:YAG-Laser) mit $\lambda_0 = 532$ nm, dazu kommt ein Helium-Neon-Laser (He-Ne-Laser) mit $\lambda_0 = 633$ nm und ein Diodenlaser mit $\lambda_0 = 785$ nm. Der emittierte Laserstrahl passiert einen Bandpassfilter, sowie gegebenenfalls optische Abschwächer zur Minderung der Strahlungsintensität, und wird anschließend über die Optik des Mikroskops auf die Probe fokussiert. Das Raman-Signal wird in 180°-Rückstreugeometrie von derselben Optik gesammelt und über einen Kanten- bzw. Kerbfilter (engl. *edge* bzw. *notch filter*) auf ein optisches Gitter (600

Linien/mm) geleitet. Schließlich erreicht das nach Wellenlänge aufgespaltene Signal die CCD-Kamera (engl. *charge coupled device*). Für die in dieser Arbeit gezeigten Spektren wurden Objektive mit 4×-, 10×-, 50×-, 100×-Vergrößerung und ein 50×-Objektiv mit langem Arbeitsabstand (50×LWD, engl. *long working distance*) verwendet (alle *Olympus Co.*, Japan). Die entsprechenden numerischen Aperturen sind $NA_{4\times} = 0,1$, $NA_{10\times} = 0,25$, $NA_{50\times} = 0,75$, $NA_{100\times} = 0,9$ und $NA_{50\times LWD} = 0,5$. Die eingesetzte Peltier-gekühlte CCD-Kamera detektiert mit 1024×256 Pixeln aufgenommene Spektren. Diese wurden mit der Software *LabSpec6* (*Horiba Scientific*, Frankreich) gespeichert und bearbeitet. Zur Spektrenbearbeitung wurden die Programme *OriginPro 2017G* (*OriginLab Cooperation*, USA) und *Microsoft Excel 2016* (*Microsoft Cooperation*, USA) verwendet.

Durch Verluste, z.B. an Spiegeln, kann nicht die gesamte Ausgangsleistung des Lasers bis an die Probe aufrechterhalten werden. Die maximale Laserleistung P auf der Probe beträgt für $P_{532\text{ nm}} = 27\text{ mW}$, $P_{633\text{ nm}} = 13,8\text{ mW}$ und $P_{785\text{ nm}} = 61\text{ mW}$, gemessen durch ein Objektiv (*Olympus Co.*, Japan) mit 10×-Vergrößerung. Die Laserleistung kann zusätzlich durch optische Abschwächer weiter reduziert werden, was beispielsweise für empfindliche Proben wichtig ist. Hierfür stehen sechs Filter zur Verfügung (50 %, 25 %, 10 %, 1 %, 0,1 % und 0,01 %), die über die Software *LabSpec6* (*Horiba Scientific*, Frankreich) ausgewählt werden können. Zusätzlich besitzt das System eine *DuoScan*-Einheit (*Horiba Scientific*, Frankreich), die mittels zweier Spiegel den Laserfokus gleichmäßig über eine vorgegebene Fläche bewegt. Damit sind hochpräzise Messungen im Größenbereich des Laserfokus möglich, was mit dem verwendeten motorisierten Tisch nicht realisierbar wäre. Außerdem kann so eine Verteilung der Laserintensität auf eine größere Fläche erreicht werden, was für sehr empfindliche Proben wichtig ist.

Das Raman-Mikroskop wird zu Beginn jedes Messtages mit Hilfe der nullten spektralen Ordnung des Gitters, sowie der Phononenbande erster Ordnung eines Siliziumwafers bei $520,7\text{ cm}^{-1}$ kalibriert.

3.1.2 RAMAN-MIKROSKOP *alpha300R*

Das Raman-Mikroskop *alpha300R* ist mit zwei Diodenlasern ausgerüstet, die Anregungswellenlängen von $\lambda_0 = 532\text{ nm}$ bzw. $\lambda_0 = 633\text{ nm}$ besitzen. Die Laserleistung kann über *TruePower* (*WITec GmbH*, Deutschland) nahezu stufenlos bis max. 80 mW und 70 mW für 532 nm- bzw. 633 nm-Laser eingestellt werden. Der Strahlengang entspricht

weitgehend dem Prinzip des Raman-Mikroskops *LabRAM HR*, mit dem Unterschied, dass zur Ein- und Auskopplung des Laserlichtes Glasfaseroptik verwendet wird. Die in dieser Arbeit gezeigten Spektren wurden mit Objektiven mit 5 \times -, 20 \times -, 50 \times -, 100 \times -Vergrößerung bzw. einem 50 \times LWD-Objektiv aufgenommen (alle *Carl Zeiss AG*, Deutschland). Die entsprechenden numerischen Aperturen betragen $NA_{5\times} = 0,13$, $NA_{20\times} = 0,4$, $NA_{50\times} = 0,75$, $NA_{100\times} = 0,9$ und $NA_{50\times\text{LWD}} = 0,55$. Das Raman-Signal wird in 180°-Rückstrahlgeometrie gesammelt, über ein optisches Gitter (600 Linien/mm) geleitet und mit einer EMCCD-Kamera detektiert. Die Spektren wurden mit der Software *ControlFive* (*WITec GmbH*, Deutschland) gespeichert und bearbeitet. Die Kalibrierung erfolgt mit der ersten Phononenordnung eines Siliziumwafers bei 520,7 cm^{-1} .

3.2 SYNTHESE DER NANOPARTIKEL

Für die Aufnahme von Referenzspektren wurden Ferrihydrit-, Magnetit- und Maghemit-Nanopartikel (NP) nach folgenden Protokollen synthetisiert.

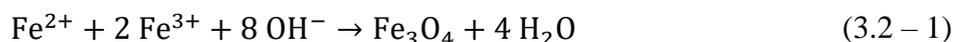
3.2.1 SYNTHESE VON FERRIHYDRIT

Die Synthese von Ferrihydrit-NP ($\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 0,5 \text{H}_2\text{O}$) basiert auf der Methode von Schwertmann und Cornell, die durch Abdus-Salam et al. modifiziert wurde [106]. Es werden 5 g Eisen(III)nitrat-Nonahydrat ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$) in 125 ml Millipore-Wasser gelöst. 82,5 ml einer 1 M Kaliumhydroxidlösung (KOH) werden unter starkem Rühren tropfenweise zugefügt, bis der pH-Wert zwischen 7 und 8 liegt. Rotbrauner Niederschlag zeigt ausfallende Ferrihydrit-NP an. Nach 30 min werden weitere 5 ml 1 M KOH-Lösung zugefügt. Dabei muss beachtet werden, dass der pH-Wert zwischen 7 und 8 bleibt. Die Reinigung der Probe erfolgt durch Zugabe von Millipore-Wasser und anschließender Zentrifugation. Dazu wird der Niederschlag gleichmäßig in *Rotilabo*®-Zentrifugenröhrchen (50 ml, *Carl Roth GmbH & Co KG*, Deutschland) aufgeteilt, sodass sich in jedem Röhrchen ein Volumen von ca. 1 cm^3 befindet. Anschließend wird mit jeweils 40 ml Millipore-Wasser suspendiert und für 5 min bei 4500 rpm und 6 °C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und der rotbraune Niederschlag erneut mit 40 ml Millipore-Wasser suspendiert. Dieser Reinigungsschritt wird so oft wiederholt, bis sich die Leitfähigkeit nicht mehr ändert.

Zum Schluss werden die Niederschläge vereinigt, vakuumfiltriert und über Nacht unter Vakuum gefriertrocknet.

3.2.2 SYNTHESE VON MAGNETIT

Die Synthese der Magnetit-NP (Fe_3O_4) gelingt über Ausfällung unter alkalischen Bedingungen und Sauerstoffausschluss. Alle verwendeten Geräte und Lösungen werden vor Verwendung mit Stickstoff gespült. Die Synthese von Magnetit erfolgt gemäß Reaktionsschema (3.2 – 1):



Es werden 1,5 g Eisen(II)chlorid-Tetrahydrat ($\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 75,4 mM) und 4,99 g Eisen(III)chlorid-Hexahydrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 184,6 mM) in 100 ml destilliertem Wasser gelöst und unter starkem Rühren auf 90 °C unter Stickstoffatmosphäre erhitzt. Sobald die Temperatur erreicht ist, werden 10 ml einer 25 wt% Ammoniaklösung (NH_4OH) tropfenweise über ein Septum zugegeben. Ein rascher Farbumschlag von braun zu schwarz kann beobachtet werden. Um eine Agglomeration der Partikel zu vermeiden, werden 1 ml 1 %-ige Ölsäure (v/v) zur Suspension gegeben. Die Suspension wird für weitere 15 min gerührt. Die magnetischen Partikel werden mit etwas Ethanol gewaschen, um überschüssige Ölsäure zu entfernen. Vor Gebrauch werden die Partikel mindestens für 24 h im Exsikkator getrocknet. Die Lagerung der Partikel erfolgt im Exsikkator [107].

3.2.3 SYNTHESE VON MAGHEMIT

Maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) entsteht durch Oxidation von Magnetit gemäß Reaktionsschema 3.2 – 2 [20]:



Um Maghemit-NP zu erhalten, werden gemäß Abschnitt 3.2.2 hergestellte Magnetit-Nanopartikel im Muffelofen bei 250 °C für 5 h in einer Sauerstoffatmosphäre erhitzt [22].

3.2.4 RAMAN-ANALYSE DER EISENOXID-NANOPARTIKEL

Die Raman-Spektren der Ferrihydrit-, Magnetit- und Maghemit-NP wurden mit dem Raman-Mikroskop *LabRAM HR* (*Horiba Scientific*, Frankreich) aufgenommen. Je eine Spatelspitze der Proben wurde auf einem Objektglaträger (*Carl Roth GmbH & Co KG*, Deutschland) platziert und jeweils Anregungswellenlängen von $\lambda_0 = 785$ nm, 633 nm und 532 nm ausgesetzt. Der Laserstrahl wurde mit einem 100×-Objektiv fokussiert (*Olympus Co.*, Japan, $NA = 0,9$). Die Verwendung der hohen Laserleistung führt zu einer Umwandlung zum thermodynamisch stabileren Hämatit, das charakteristische Banden bei 226 cm^{-1} , 293 cm^{-1} , 410 cm^{-1} , 496 cm^{-1} und 611 cm^{-1} (*SpectralID 3.03*, *Thermo Scientific*, USA) hervorruft. Daher wurde die Laserleistung auf 6,1 mW für 785 nm, auf 1,4 mW für 633 nm und auf 2,7 mW für 532 nm reduziert (jeweils optischer Abschwächer 10%). Die Integrationszeit für jedes Spektrum betrug 10 s und die Anzahl der Akkumulationen 30.

3.2.5 DATENVERARBEITUNG DER RAMAN-SPEKTREN

Ferrihydrit-, Magnetit- und Maghemit-NP produzieren in den Raman-Spektren je eine intensive Bande bei etwa 700 cm^{-1} . Aus diesem Grund wurden alle Raman-Spektren auf den ausgeprägten Peak bei 700 cm^{-1} normiert. Direkt nach Aufnahme der Spektren wurde mittels *LabSpec6* (*Horiba Scientific*, Frankreich) eine ICS-Basislinienkorrektur (engl. *internal intensity correction*, *Horiba Scientific*, Frankreich) zur Entfernung von *etaloning* vorgenommen. *Etaloning* beschreibt einen optischen Effekt, der auftritt, wenn Silizium in der CCD-Kamera transparent wird. Diese Transparenz nimmt für Licht höherer Wellenlängen und im NIR zu und führt dadurch zu einer ungleichmäßigen spektralen Empfindlichkeit. Aus jeweils 10 Spektren einer Probe wurde ein Mittelwertspektrum errechnet.

3.3 HERSTELLUNG VON MAGNETOFERRITIN

Die Magnetoferritin-Proben und deren rekombinant hergestelltes Apoferritin wurden von den Projektpartnern des IBMI bereitgestellt. Der Vollständigkeit halber wird das Grundprinzip der Magnetoferritin-Herstellung kurz dargestellt.

Ein einfacher Herstellungsweg von Magnetoferritin wurde von Jordan et al. vorgeschlagen [5]. Alle Glasgeräte und Chemikalien werden vor Verwendung mit Stickstoff gespült und die Herstellung wird durchgehend unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Beim Apoferritin handelte es sich um rekombinant hergestelltes Apoferritin.

Unter sanftem Rühren wird eine 2 μM Apoferritinlösung in 0,5 M HEPES Puffer (pH 8,5, 50 ml) für ca. 30 min entgast, bevor die Lösung auf 60 °C erwärmt wird. Sobald die Temperatur erreicht ist, wird mit Hilfe von automatisierbaren Pumpen mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/min gleichzeitig 25 mM Ammoniumeisen(II)-sulfat $((\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2)$ und 8,33 mM Wasserstoffperoxidlösung (H_2O_2 , 30 %) zugegeben, bis die Lösung sich leicht bräunlich verfärbt. Durch Zugabe von 1 ml Natriumcitrat (300 mM) werden überschüssige Eisenionen entfernt. Zur Aufreinigung wird die Proteinlösung bei 5000 rpm und 10 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird für 12 h in einer Natriumchloridlösung (150 mM) dialysiert und zur Aufbereitung bei 5000 rpm und 10 °C für 20 min zentrifugiert. Die Lagerung der Magnetoferritin-Lösung erfolgt unter Ausschluss von Sonnenlicht bei 4 °C. Im späteren Verlauf wurde die Dialyse durch die Gelpermeationschromatografie (SEC, engl. *size exclusion chromatography*) ersetzt.

3.4 RAMAN-ANALYSE DER FERRITIN-PROBEN

Ferritin und Apoferritin von Equine Spleen (Eq-Ft/Eq-ApoFt) wurden von *Sigma Aldrich*, Deutschland, erworben. Die Proteine sind zusätzlich in eine Matrix eingebettet, die die Haltbarkeit der Probe gewährleisten soll. Die zur Stabilisierung eingesetzten Substanzen können die Raman-Analyse störend beeinflussen, weswegen eine Aufbereitung von Apoferritin und Ferritin vor der Messung notwendig ist.

Die Magnetoferritin-Proben und deren rekombinant hergestelltes Apoferritin (MFt/rApoFt) wurden von den Projektpartnern des IBMI bereitgestellt. Auch hier ist die Entfernung zusätzlich verwendeter Substanzen, wie z.B. Puffer, vor jeder Messung notwendig.

3.4.1 ALLGEMEINE VORSCHRIFT ZUR AUFBEREITUNG DER FERRITIN-PROBEN

Gereinigt und aufkonzentriert wurden die Proben mit Hilfe von *Amicon*[®] Ultra-Zentrifugenfiltereinheiten (0,5 ml, 30 kDa, *Merck KGaA*, Deutschland). Abbildung 3.2 gibt die bildliche Veranschaulichung des Funktionsprinzips wieder.

Jeweils 25 µl der Probe werden in die Filtereinheit pipettiert und mit 100 µl Millipore-Wasser suspendiert. Diese Filtereinheit wird in die entsprechenden Zentrifugenröhrchen eingefügt und bei 14000 rpm und 10 °C für 10 min zentrifugiert. Der gesammelte Überstand wird verworfen und der Rückstand in der Filtereinheit erneut mit 100 ml Millipore-Wasser suspendiert. Dieser Schritt wird 3-mal wiederholt. Anschließend wird die Filtereinheit umgedreht in ein neues Zentrifugenröhrchen eingefügt und dieses für 1 min bei 4000 rpm und 10 °C zentrifugiert. Ein Aliquot des konzentrierten Rückstandes (1 µl) wird auf einem Aluminium-beschichteten Glasträger (*EMF Dynasil*, USA) für wenige Minuten luftgetrocknet und direkt mittels RM gemessen.

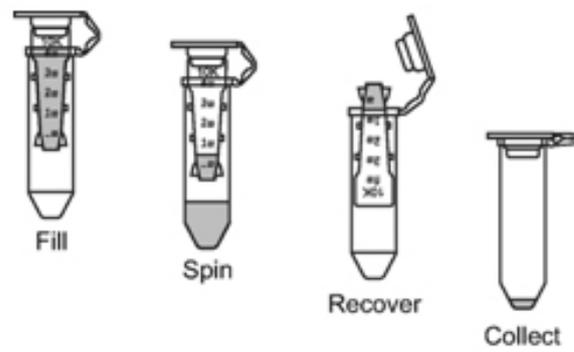


Abbildung 3.2: Die Amicon®Ultra-Zentrifugationseinheiten (0,5 ml, 30 kDa, Merck KGaA, Deutschland) bestehen aus zwei Teilen: der Filtereinheit und dem Zentrifugenröhrchen. Die Filtereinheiten besitzen eine Porengröße von 30 kDa. Dabei werden während der Zentrifugation die zugegebenen Substanzen beseitigt, während das Ferritin in der Filtereinheit zurückbleibt [108].

3.4.2 RAMAN-ANALYSE DER FERRITIN-PROBEN

Die Proben wurden mit dem Raman-Mikroskop *LabRAM HR* (*Horiba Scientific*, Frankreich) gemessen. Als Proben-Trägermaterial wurde ein Aluminium-beschichteter Glasträger (*EMF Dynasil*, USA) verwendet. Aluminium zeigt keine Raman-Signale und erleichtert damit die Zuordnung der Banden des Eisenkerns und des Proteins. Für die Messungen wurden Anregungswellenlängen von $\lambda_0 = 785 \text{ nm}$ und $\lambda_0 = 532 \text{ nm}$ eingesetzt und jeweils mit einem 100×-Objektiv fokussiert (*Olympus Co.*, Japan, $NA = 0,9$).

Raman-Analyse von Eq-Ft/Eq-ApoFt

Für die Raman-Analyse von Eq-ApoFt wurde ein optischer Abschwächer von 10 % verwendet (785 nm, ca. 6,1 mW; 532 nm, ca. 2,7 mW). Die Spektren wurden jeweils mit einer 25-fachen Akkumulation von 10 s aufgenommen.

Ferritin neigte zu thermischer Zersetzung, die durch schwarze Flecken auf der Probe sichtbar wurden. Daher wurde zur Reduktion der Laserleistung ein optischer Abschwächer von 10 % verwendet (785 nm, 6,1 mW; 532 nm, ca. 2,7 mW). Die Integrationszeit betrug jeweils 10 s, die Zahl der Akkumulationen 100.

Raman-Analyse von MFt/rApoFt

Für die Raman-Analyse von rApoFt wurde ein optischer Abschwächer von 10 % verwendet (785 nm, ca. 6,1 mW; 532 nm, ca. 2,7 mW). Die Spektren wurden jeweils mit einer 25-fachen Akkumulation von 10 s aufgenommen.

Die Raman-Analyse von MFt erfolgt analog der von Eq-ApoFt. Um thermische Zersetzung der Probe zu vermeiden, wurde ein optischer Abschwächer von 10 % verwendet (785 nm, ca. 6,1 mW; 532 nm, ca. 2,7 mW). Die Integrationszeit war eine 100-fache Akkumulation von je 10 s.

3.4.3 DATENVERARBEITUNG DER FERRITIN-PROBEN

Die Raman-Spektren werden auf die Bande bei 1450 cm^{-1} , die von der C-H-Deformationsschwingung stammt, normiert, da ihre Intensität nicht zu fluktuieren scheint und die Signalstärke beibehält [109]. Direkt nach Aufnahme des Spektrums wurde mittels *LabSpec6* (*Horiba Scientific*, Frankreich) eine ICS-Basislinienkorrektur zur Entfernung von *etaloning* vorgenommen. Jeweils zehn Spektren wurden zu einem Mittelwertspektrum gerechnet.

3.5 RAMAN-ANALYSE VON FERRITIN IN LYSOSOMEN

Die lysosomalen Proben wurden von den Projektpartnern des IBMI bereitgestellt. Vor jeder Messung wurden die Proben gemäß 3.4.1 mittels *Amicon*[®]*Ultra*-Zentrifugeneinheiten

(0,5 ml, 30 kDa, Merck KGaA, Deutschland) aufgereinigt und aufkonzentriert und anschließend auf einem Aluminium-beschichteten Glasträger (*EMF Dynasil*, USA) platziert. Die Proben wurden mit dem Raman-Mikroskop *LabRAM HR* (*Horiba Scientific*, Frankreich) gemessen. Für die Messungen wurden die Anregungswellenlängen von $\lambda_0 = 785$ nm verwendet und mit einem 100×-Objektiv fokussiert (*Olympus Co.*, Japan, $NA = 0,9$). Für die Messung mit einem optischen Abschwächer von 10 % (785 nm, ca. 6,1 mW) wurde eine Integrationszeit von 10 s und die Akkumulation von 100 gewählt. Für die Messung mit einem optischen Abschwächer von 50 % (785 nm, ca. 30,5 mW) wurde eine Integrationszeit von jeweils 10 s und als Akkumulation wurde einmal 10 und einmal 100 gewählt.

3.6 MODELLSTUDIE: REDUKTIVE TRANSFORMATION VON FERRIHYDRIT ZU MAGNETIT

3.6.1 EXPERIMENTELLER AUFBAU

Drei Modelle wurden für die Untersuchung der Umwandlung von Ferrihydrit (*Fh*) zu Magnetit (*Mag*) konzipiert. Alle Tests wurden im Dunkeln durchgeführt, um lichtinduzierte Veränderungen der Probe zu vermeiden. Für die Tests wurde HEPES-Puffer (1 M) verwendet, dessen pH auf 7,4 eingestellt ist. Als Kontrolle galt in HEPES-Puffer inkubiertes *Fh*, das parallel zu jedem Experiment neu angesetzt wurde. Die Inkubationszeit entsprach dem jeweiligen Experiment. Ein Aliquot von 5 μ l jeder Probe wurde für die Raman-Messung auf einem Objektglasträger (*Carl Roth GmbH & Co KG*, Deutschland) platziert.

Modell 1

10 mg *Fh* wurden in 250 μ L ml HEPES-Puffer suspendiert. Jeweils 100 μ l Pyruvat (*Pyr*), Acetat (*AcO*), Lactat (*Lac*) und Ascorbinsäure (*Asc*) (alle Lösungen mit einer molaren Konzentration von 1 M) wurden zur Suspension zugefügt und für 24 h am Überkopfschüttler inkubiert. Mit einer Konzentration von jeweils 1 M *AcO* und *Asc* (jeweils 100 μ l) wurde das Experiment unter Sauerstoffausschluss wiederholt.

Im weiteren Experiment wurden jeweils 100 μ l von verschieden konzentrierter *Asc* zu *Fh* gegeben. Dafür wurden 10 mg *Fh* in 500 μ l HEPES-Puffer suspendiert. Die verwendeten Konzentrationen der Ascorbinsäure sind in untenstehender Tabelle 3.1 angezeigt. Die Raman-Analyse erfolgte nach einer Inkubationszeit am Überkopfschüttler von etwa 2 h.

Tabelle 3.1: Zugesezte Konzentrationen in M an Asc.

100 mM	50 mM	20 mM	10 mM	5 mM	1 mM	100 μ M	10 μ M	1 μ M
--------	-------	-------	-------	------	------	-------------	------------	-----------

Modell 2

Folgende Experimente wurden einmal unter Sauerstoffatmosphäre und einmal unter Sauerstoffausschluss durchgeführt. Dazu wurden zu jeweils in 10 mg *Fh* in 250 μ L ml HEPES-Puffer suspendiert und mit jeweils 50 μ l Cysteinlösung (*Cys*, 1 M) und *AcO*, (1 M) für 5 h und nach 8 d am Überkopfschüttler inkubiert. Jeden zweiten Tag erfolgte eine erneute Zugabe von je 50 μ l *Cys*-Lösung (1 M) und *AcO* (1 M).

Modell 3

Folgende Experimente wurden ebenfalls jeweils unter Sauerstoffatmosphäre und unter Sauerstoffausschluss durchgeführt. Dazu wurden zu jeweils in 10 mg *Fh* in 250 μ L ml HEPES-Puffer suspendiert. Für jedes Experiment wurden je 50 μ l *Cys*-Lösung (1 M), Ammoniumeisen(II)-sulfat ((NH_4)₂Fe(SO₄)₂, 1 M) und *AcO* (1 M) für 5 h und nach 8 d am Überkopfschüttler inkubiert. Jeden zweiten Tag erfolgte eine erneute Zugabe von je 50 μ l *Cys*-Lösung (1 M), (NH_4)₂Fe(SO₄)₂ (1 M) und *AcO* (1 M). Die Zugabe der Lösungen erfolgte nach dem Schema gemäß Tabelle 3.2.

Tabelle 3.2: Schematische Darstellung der verwendeten Substanzen für die jeweiligen Experimente. (+) entspricht Zugabe, (-) bedeutet keine Zugabe.

	<i>Fh</i>	(NH_4) ₂ Fe(SO ₄) ₂	<i>AcO</i>	<i>Cys</i>
Unter Sauerstoffatmosphäre				
Kontrolle	+	-	-	-
Modell 1	+	+	-	-
Modell 2	+	+	+	-
Modell 3	+	+	+	+
Unter Sauerstoffausschluss				
Kontrolle	+	-	-	-
Modell 1	+	+	-	-
Modell 2	+	+	+	-
Modell 3	+	+	+	+

3.6.2 RAMAN-ANALYSE UND DATENVERARBEITUNG

Alle Proben wurden mit dem Raman-Mikroskop *alpha300R* (*WITec GmbH*, Deutschland) bei einer Anregungswellenlänge $\lambda_0 = 633$ nm aufgenommen. Die Laserleistung betrug 1 mW und ein 50×LWD-Objektiv (*Carl Zeiss AG*, Deutschland, $NA = 0,55$) wurde verwendet. Eine 30-fache Akkumulation von 10 s wurde als Integrationszeit verwendet.

Die Spektren wurden wie bei 3.2.5 beschrieben bearbeitet. Alle Raman-Spektren wurden auf den ausgeprägten Peak bei 700 cm^{-1} normiert.

3.7 RAMAN-ANALYSE DES ENCAPSULIN-KOMPARTIMENTS

Die Encapsulin-Kompartiment-Proben wurden von den Projektpartnern des IBMI zur Verfügung gestellt. Die Proben wurden vor jeder Messung gemäß 3.4.1 mittels *Amicon® Ultra*-Zentrifugeneinheiten (0,5 ml, 30kDa, *Merck KGaA*, Deutschland) aufgereinigt und aufkonzentriert und anschließend auf einem Aluminium-beschichteten Glasträger (*EMF Dynasil*, USA) platziert.

Alle Proben wurden mit dem Raman-Mikroskop *alpha300R* (*WITec GmbH*, Deutschland) mit einer Anregungswellenlänge $\lambda_0 = 532$ nm spektroskopiert. Die Laserleistung betrug 1 mW und ein 100×Objektiv (*Carl Zeiss AG*, Deutschland, $NA = 0,9$) wurde verwendet. Eine jeweils 10-fache, 100-fache und 200-fache Akkumulation von 10 s wurde als Integrationszeit gewählt.

3.8 WEITERE VERWENDETE METHODEN

3.8.1 MÖSSBAUER-SPEKTROSKOPIE

Die Messungen der Proben erfolgten bei Temperaturen von 298 K bzw. 4,2 K. Als Anregungsquelle wurde ^{57}Co in Rhodium verwendet. Die synthetisierten Nanopartikel Ferrihydrit, Magnetit und Maghemit wurden in spezielle Probenhalter gegeben, in flüssigem Stickstoff gekühlt und dann in ein Flüssigheliumbad des Kryostats transportiert. Die Mößbaueranalyse flüssiger Proben wie Eq-Ft erfolgte bei 4,2 K.

3.8.2 RÖNTGENBEUGUNG (XRD)

Ferrihydrit-, Magnetit- und Maghemit-NP wurden direkt in spezifische Halter für die XRD-Analyse überführt. Die Eq-Ft-Proben wurden vor Anwendung der Messung gefriergetrocknet. Die Analyse wurde in einer Transmissionsgeometrie mit einem *Powder Diffraction System* von *STOE & Cie GmbH*, Deutschland, durchgeführt. Als Anregungsquelle wurde eine MoK α -Source ($\lambda = 0,70930 \text{ \AA}$) verwendet.

3.8.3 MASSENSPEKTROMETRIE MIT INDUKTIV GEKOPPELTEM PLASMA (ICP-MS)

Der Eisengehalt der Proben Eq-Ft und Eq-ApoFt wurde mittels Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS, *Perkin Elmer ICP/MS Elan 6100*, USA) ermittelt. Dazu wurde vor jeder Analyse ein Mikrowellen-Aufschluss mit Flusssäure und Salpetersäure (1:3) für 10 min bei 130 °C, für 10 min bei 180 °C und 30 min bei 210 °C vorgenommen. Jede Probe wurde dann mit Millipore-Wasser in einem Verhältnis von 1:70 (v/v) verdünnt. Multielement-Standard-Lösung für ICP IV (23 Elemente: Ag, Al, B, Ba, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ga, In, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sr, Tl, Zn; jeweils 1000 mg/l, *Carl Roth GmbH & Co KG*, Deutschland) und Millipore-Wasser wurden als Standard bzw. Blindkontrolle verwendet.

3.8.4 RASTERELEKTRONENMIKROSKOPIE (REM)

Rasterelektronenmikroskopische (REM)-Aufnahmen wurden mit einem SIGMA VP 300 Mikroskop (*Carl Zeiss AG*, Deutschland) bei einer Hochspannung von 10 kV erzeugt. Die Blendengröße war dabei 30 μm und ein Arbeitsabstand von 3,5 mm bis 4,5 mm wurde benötigt. Ein Aliquot wurde auf einem für die mikroskopischen Aufnahmen angefertigten Aluminium-Träger platziert. Die Größenverteilung der Partikel wurden mit der Software *ImageJ* (*National Institute of Health*, USA) ermittelt.

3.8.5 ENERGIEDISPERSIVE RÖNTGENSPEKTROSKOPIE (EDX)

Die EDX-Analysen erfolgten im REM und die Proben wurden dabei auf einem Aluminiumbeschichteten Träger (*EMF Dynasil*, USA) platziert und eingetrocknet. Als Detektor kam ein XFlash 6 | 60 Quantax EDS (*Bruker Corporation*, USA) zum Einsatz. Die Elektronenquelle war eine Schottky-Kathode (*Carl Zeiss AG*, Deutschland).

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 RAMAN-ANALYSE DER MAGNETIT-, MAGHEMIT- UND FERRIHYDRIT-NANOPARTIKEL

Die einfachste Möglichkeit für die qualitative Analyse von Raman-Spektren ist der Abgleich mit Referenzspektren. Bandenpositionen und Bandenform enthalten genügend Informationen, um in den meisten Fällen eine eindeutige Zuordnung zu erlauben. Die vorliegende Arbeit fokussiert sich auf die Untersuchung der chemischen und strukturellen Zusammensetzung der Eisenoxide bzw. -hydroxide des Kerns in Ferritin und Magnetoferritin. Hierzu wurden Referenzspektren von Ferrihydrit, Magnetit und Maghemit benötigt. Obwohl Eisenoxide und -hydroxide bereits mittels Raman-Spektroskopie genau untersucht wurden und deren Raman-Spektren in diversen Fachpublikationen veröffentlicht wurden, liegen immer noch Diskrepanzen in ihren Raman-Signaturen vor. Insbesondere Verbindungen mit einem geringen Grad an Kristallinität wie z.B. Ferrihydrit, stellen eine Herausforderung in der Raman-Analyse dar, denn schwach kristallisierte Minerale führen zu einer Verbreiterung der Banden und erschweren damit die zuverlässige Bandenzuordnung [95].

Aus diesem Grund wurden Ferrihydrit-, Magnetit- und Maghemit-Nanopartikel (NP) synthetisiert und anschließend Raman-spektroskopisch charakterisiert. Die Verifizierung erfolgte mittels der Methoden Mößbauer-Spektroskopie und Röntgenbeugungsanalyse (XRD, engl. *X-ray diffraction*).

4.1.1 SYNTHESE DER NANOPARTIKEL

Die Synthese der Ferrihydrit-NP ($\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 0,5 \text{H}_2\text{O}$) erfolgte nach dem Protokoll von Abdus-Salam et al. [106], der Magnetit-NP (Fe_3O_4) nach Petcharoen et al. [107] und der Maghemit-NP ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) nach Cornell und Schwertmann [22].

Die Darstellung der Magnetit-NP basiert auf einer Co-Präzipitation von divalenten (Fe^{2+}) und trivalenten (Fe^{3+}) Eisenionen im Mischungsverhältnis von etwa 1:2. Die Ausfällung fand unter alkalischen Bedingungen ($\text{pH} = 8.2$) und Sauerstoffausschluss statt. Der entstandene schwarze Niederschlag ließ sich durch das Feld eines Permanentmagneten anziehen (Abbildung A1 im Anhang).

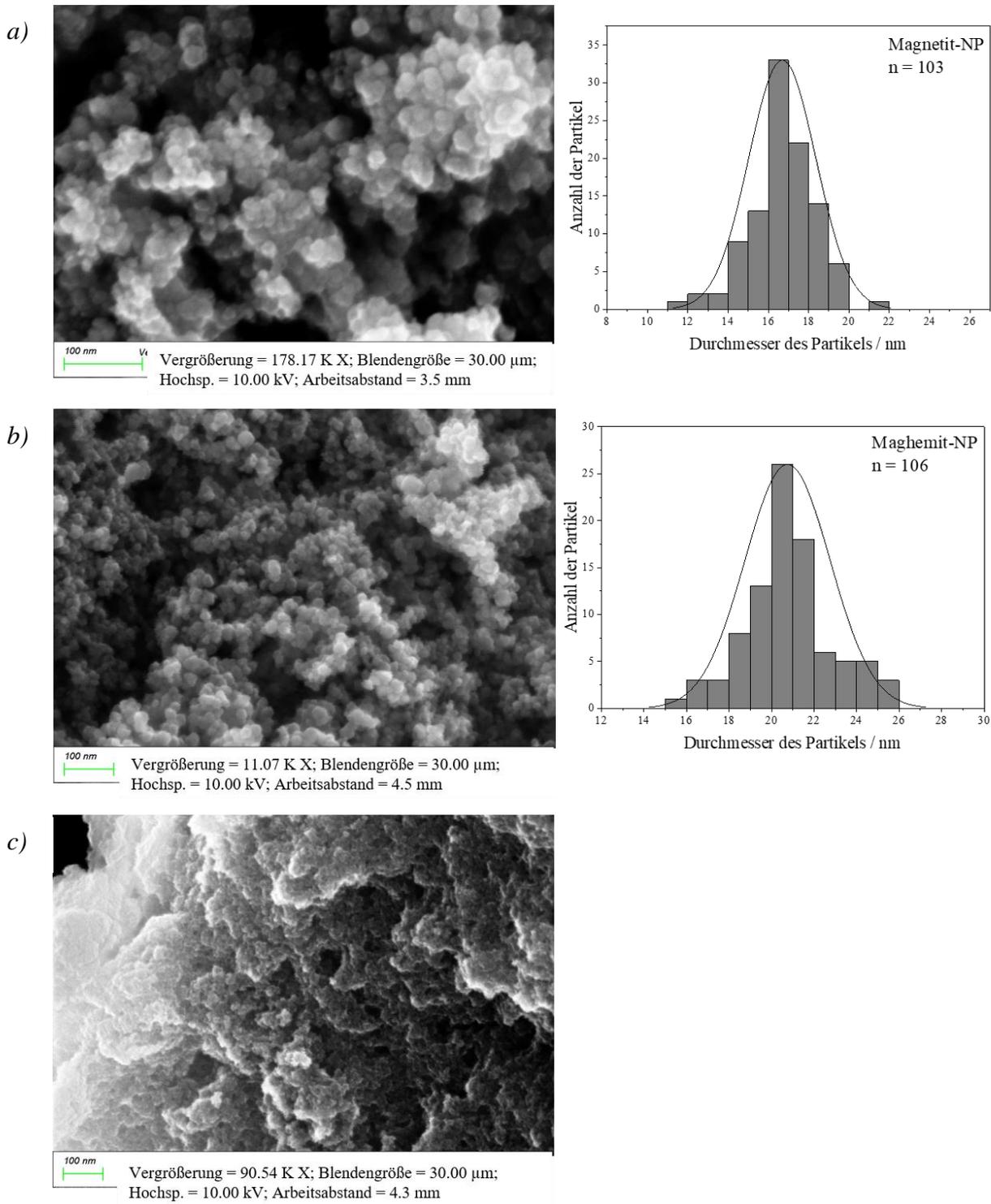


Abbildung 4.1: REM- Aufnahmen der Maghemit- (a), Magnetit- (b) und Ferrihydrit-NP (c). Die Verteilung der Durchmesser der Maghemit- und Magnetit-NP (a, b) sind im daneben liegenden Histogramm gezeigt.

Maghemit-NP wurden durch Erhitzen der nach Petcharoen et al., 2012 [107], synthetisierten Magnetit-NP in Luft hergestellt, dabei konnte eine Farbänderung von schwarz zu braun beobachtet werden. Wie Magnetit-NP ließen sich auch die Maghemit-NP vom Feld eines Permanentmagneten anziehen (Abbildung A1 im Anhang). Die Synthese von Ferrihydrit-NP ist eine Ausfällung unter leicht alkalischen Bedingungen. Im Gegensatz zu Magnetit und Maghemit zeigen die rotbraunen Ferrihydrit-NP in Anwesenheit eines Permanentmagneten keine magnetischen Eigenschaften (Abbildung A1 im Anhang).

Mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie (REM) wurde die Partikelgröße bestimmt. Die REM-Aufnahmen in Abbildung 4.1 zeigen eine enge Größenverteilung der Nanopartikel. Die Durchmesser von 106 einzelnen Magnetit-NP und 103 Maghemit-NP wurden mit Hilfe der Software *ImageJ* (*National Institute of Health*, USA) festgestellt. Für Magnetit-NP wurde eine durchschnittliche Größe von $16,6 \pm 3,4$ nm, für Maghemit-NP von $20,7 \pm 2$ nm ermittelt.

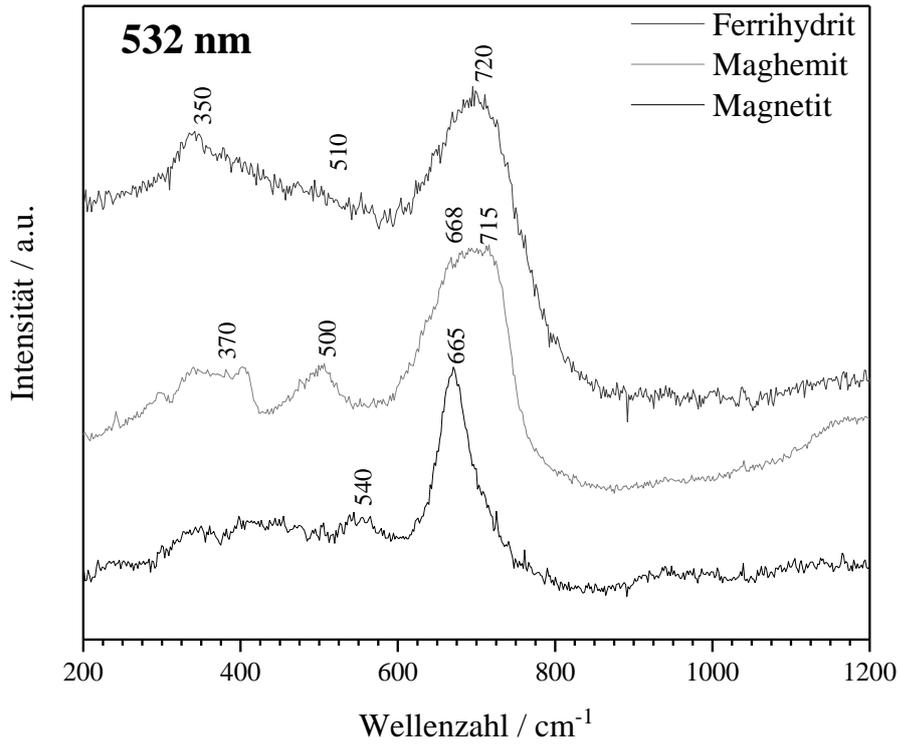
Das Abschätzen der Größe der Ferrihydrit-NP in den REM-Aufnahmen ist durch die vermutete kleine Größe unter 5 nm erschwert. Zudem neigen NP generell durch das hohe Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis zur Agglomeration [1, 110], was die Folge hat, dass die Erkennung einzelner Nanopartikel limitiert ist. Im Falle von Ferrihydrit-NP ist die Tendenz zur Agglomeration bedingt durch die nanokristalline Größe im Vergleich zu den anderen beiden NP erhöht [38]. Für die weiteren Experimente werden separierte Einzelpartikel benötigt. Die Neigung zur Agglomeration ist daher kontraproduktiv.

Die REM-Aufnahmen beweisen, dass die Partikel eine enge Größenverteilung im nm-Bereich aufweisen und somit zur Erstellung der Referenzspektren verwendet werden können.

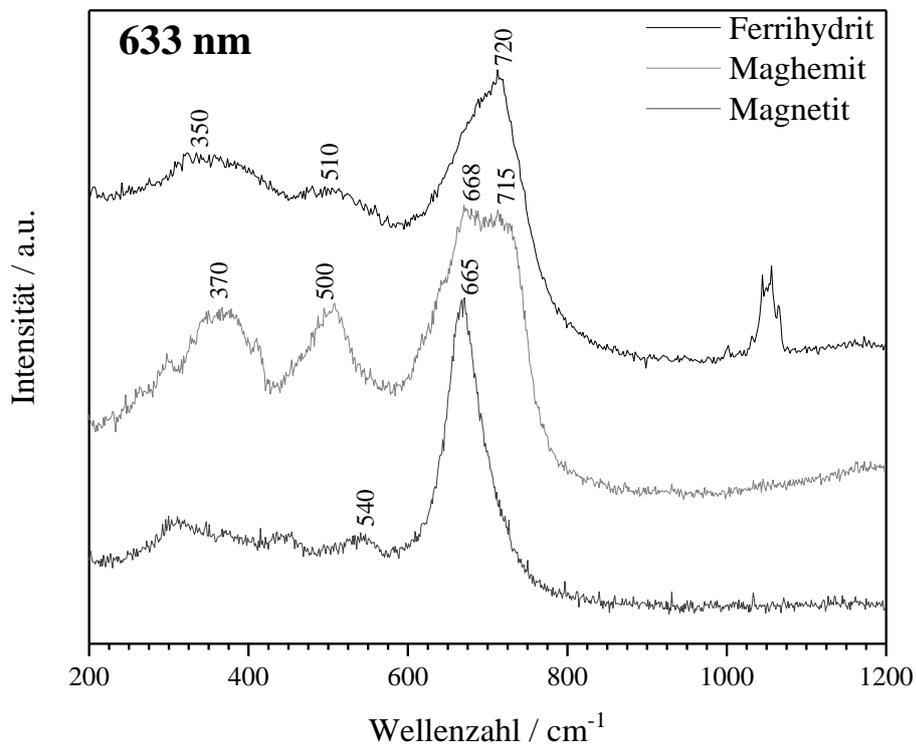
4.1.2 RAMAN-ANALYSE DER NANOPARTIKEL

Im nächsten Schritt wurden die Referenzsubstanzen mittels Raman-Mikrospektroskopie (RM) analysiert. Alle Partikel wurden mit Anregungswellenlängen von $\lambda_0 = 532$ nm, 633 nm und 785 nm untersucht, um die Bandenform und die Positionen der Wellenzahlverschiebung bei Verwendung der verschiedenen Anregungswellenlängen zu vergleichen (Abbildung 4.2).

a)



b)



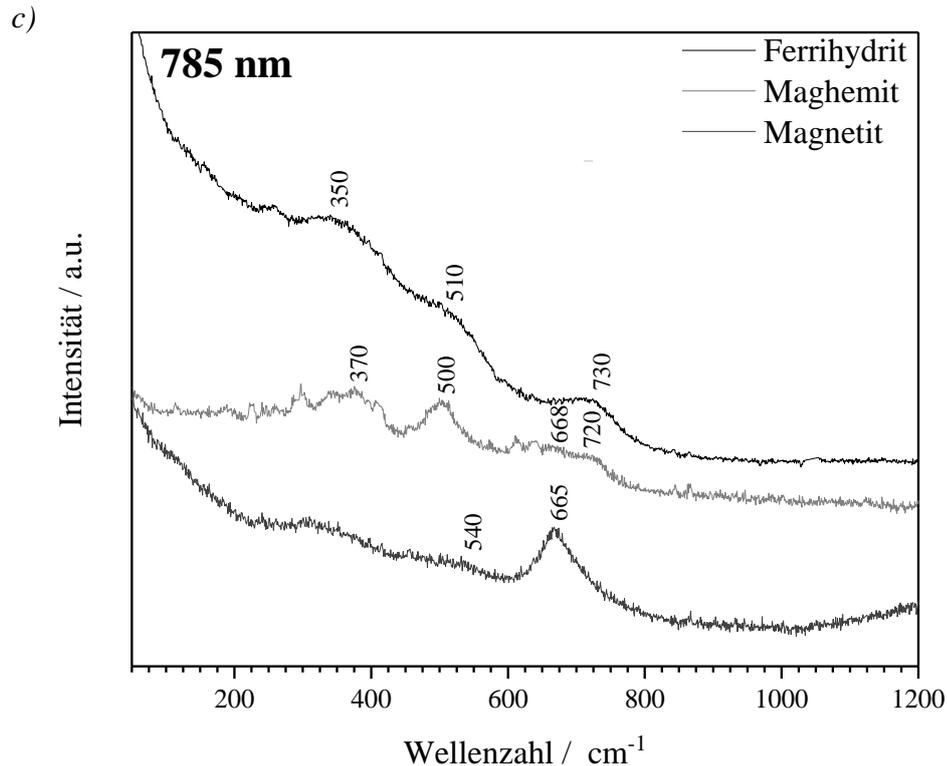


Abbildung 4.2: Anregungswellenlänge $\lambda_0 = 532 \text{ nm}$ (a), 633 nm (b) und 785 nm (c). Es befindet sich jeweils oben das Raman-Spektrum von Ferrihydrit, jeweils in der Mitte das von Maghemit und jeweils unten das von Magnetit. Alle NP wurden mit 10 % der maximalen Laserleistung und $100\times$ -Objektiv und einer 30-fach akkumulierten Integrationszeit von 10 s aufgenommen.

Die informationsreichsten Raman-Spektren wurden mit $\lambda_0 = 633 \text{ nm}$ erreicht (Abbildung 4.2 b): Das Raman-Spektrum von synthetisiertem Magnetit besteht aus einer starken Bande bei 665 cm^{-1} und einer schwachen bei 540 cm^{-1} . Die synthetisierten Maghemit-NP werden durch eine breite Bande bei 700 cm^{-1} , bestehend aus zwei Maxima bei 668 cm^{-1} und 715 cm^{-1} , charakterisiert. Zusätzlich zeigt Maghemit zwei mittelstarke Banden bei 370 cm^{-1} and 500 cm^{-1} , die eine ähnliche Intensität besitzen. Das Raman-Spektrum von Ferrihydrit-NP zeigt eine starke Bande bei 720 cm^{-1} und zwei schwache Banden bei 350 cm^{-1} und 510 cm^{-1} .

Die Raman-Spektren von Magnetit, Maghemit und Ferrihydrit, die bei $\lambda_0 = 532 \text{ nm}$ aufgenommen wurden, zeigen Ähnlichkeiten mit denen, aufgenommen bei $\lambda_0 = 633 \text{ nm}$ (Abbildung 4.2 a). Die Bandenpositionen und Form im Raman-Spektrum von Magnetit ändern sich durch einen Wechsel der Anregungswellenlänge auf $\lambda_0 = 532 \text{ nm}$ kaum (starke Bande bei 665 cm^{-1} , schwache Bande bei 540 cm^{-1}). Maghemit zeigt die starke breite Bande bei 700 cm^{-1} und zwei mittelstarke Banden mit ähnlicher Intensität bei 370 cm^{-1} und

500 cm⁻¹. Auffallend jedoch ist, dass die Maxima in der Bande bei 700 cm⁻¹ nicht signifikant erkennbar sind, sondern durch ein Plateau verbunden sind. Ferrihydrit zeigt auch hier drei Banden bei 350 cm⁻¹, 510 cm⁻¹ und 720 cm⁻¹, wobei die Intensität der schwachen Bande bei 510 cm⁻¹ im Vergleich zum Raman-Spektrum bei $\lambda_0 = 633$ nm abgenommen hat.

Stärkere Änderungen in den Raman-Spektren der drei Eisenverbindungen konnte nach Anregung mit $\lambda_0 = 785$ nm beobachtet werden (Abbildung 4.2 c). Die Intensität der markanten Bande bei 665 cm⁻¹ im Raman-Spektrum von Magnetit, bei 700 cm⁻¹ im Raman-Spektrum von Maghemit und bei 730 cm⁻¹ im Raman-Spektrum von Ferrihydrit sank stark. Außerdem konnte ein breiterer Abstand der Maxima der charakteristischen Bande des Maghemits bei 700 cm⁻¹ verzeichnet werden (668 cm⁻¹ und 720 cm⁻¹). Zudem hat sich das Maximum der breiten Bande bei 700 cm⁻¹ im Raman-Spektrum von Ferrihydrit leicht in Richtung des höheren Wellenlängenbereichs verschoben (730 cm⁻¹). Die Unterschiede in den Spektren könnten durch den Einfluss von unterschiedlichem Fluoreszenz- und Streuungsuntergrund erklärt werden.

Die Positionen der Maxima aller Banden von Magnetit, Maghemit und Ferrihydrit, aufgenommen bei $\lambda_0 = 633$ nm, 532 nm und 785 nm, werden in folgender Tabelle 4.1 zusammengefasst.

Tabelle 4.1: Vergleich der jeweiligen Positionen der Bandenmaxima in cm⁻¹ im Raman-Spektrum von Magnetit, Maghemit und Ferrihydrit, aufgenommen bei $\lambda_0 = 633$ nm, 532 nm und 785 nm. Die Intensität der Banden werden mit dem Kürzel *s* (engl. *strong*) für stark, *m* (engl. *medium*) für mittelstark und *w* (engl. *weak*) für schwach angegeben.

	Magnetit	Maghemit	Ferrihydrit
633 nm	540(w), 665(s)	370(m), 500(m), 700(s), mit Maxima bei 668 und 715	350(w), 510(w), 720(s)
532 nm	540(w), 665(s)	370(m), 500(m), 700(s), die Maxima sind schwer zu erkennen	350(w), 510(w), 720(s)
785 nm	540(w), 665(m)	370(m), 500(m), 700(w), mit Maxima bei 668 und 720	350(w), 510(w), 730(w)

Einige Raman-Spektren aus der Literatur stimmen mit denen der synthetisierten Referenz-NP überein [20, 33, 95, 110-113]. Das bestbekannte Raman-Spektrum und von den meisten

Autoren übereinstimmend gezeigte Spektrum ist das von Magnetit. Die Autoren berichten von einem Raman-Spektrum mit einer starken Bande, deren Maximum zwischen 661 cm^{-1} und 676 cm^{-1} variiert, und einer zusätzlichen schwachen Bande bei 540 cm^{-1} [20, 33, 111].

Diese veröffentlichten Raman-Spektren von Magnetit ähneln den in Abbildung 4.2 gezeigten Spektren nach Anregung mit einer Wellenlänge $\lambda_0 = 633\text{ nm}$, 532 nm und 785 nm . Das Maximum der starken Bande im Raman-Spektrum von Magnetit (665 cm^{-1}) befindet sich innerhalb des von den Autoren berichteten Bereichs und weist ebenfalls eine schwache Bande bei 540 cm^{-1} auf.

Für Maghemit wurde eine kleinere Zahl an Raman-Spektren gefunden, die mit den in Abbildung 4.2 gezeigten Raman-Spektren übereinstimmen [33, 111, 112]. Diese können mit einer starken, breiten Bande bei 700 cm^{-1} mit zwei Maxima und zwei mittelstarken Banden bei 370 cm^{-1} und 500 cm^{-1} mit gleicher Intensität identifiziert werden. Im Gegensatz zu Magnetit sind die veröffentlichten Raman-Spektren uneinheitlicher bezüglich ihrer genauen Bandenpositionen und dem Vorhandensein der Maxima in der breiten Bande bei 700 cm^{-1} . Dies liegt an der variablen Kristallinität des Minerals, die abhängig von den Proben, von der Probenvorbereitung und Art des Ausgangsstoffes, z.B. als Oxidationsprodukt aus Magnetit oder nach Dehydration aus Lepidokrokit, zu sein scheint [33].

Kristalline Verbindungen mit einem sehr geringen Grad an Kristallinität, wie z.B. Ferrihydrit, führen zu einer Verbreiterung der Raman-Banden, was die zuverlässige und genaue Raman-Analyse limitiert. Bisher wurden nur wenige Raman-Spektren veröffentlicht, die den Raman-Spektren von in dieser Arbeit synthetisiertem Ferrihydrit ähneln [95].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es nicht ausgeschlossen ist, dass einige Messbedingungen, wie z.B. hohe Laserleistung, Anregungswellenlänge λ_0 oder Integrationszeit einen Einfluss auf die Kristallinität des Minerals ausüben können. Die RM ist in der Lage solche Änderungen sichtbar zu machen. Dies könnte auch eine Erklärung dafür sein, dass die (geringfügigen) Unterschiede der Bandenpositionen der veröffentlichten Raman-Spektren von Magnetit, Maghemit und Ferrihydrit durch unterschiedliche Messbedingungen hervorgerufen wurden. Infolgedessen stellen die veröffentlichten Raman-Spektren aus der Literatur nicht immer eine zuverlässige Quelle für ein Referenzspektrum für die Analyse des Eisenkerns von Ferritin und Magnetoferritin dar. Die Generierung hauseigener Spektren unter gleichen Messbedingungen ist essentiell. Zudem wurde beobachtet, dass die Raman-Spektren von Magnetit, Maghemit und Ferrihydrit bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen λ_0 (geringfügig) abweichen können, insbesondere bei Anwendung von $\lambda_0 = 785\text{ nm}$. Für eine zuverlässige Bandenzuordnung der

Ferritin- und Magnetoferritin-Proben ist es ratsam die gleiche Anregungswellenlänge λ_0 wie zur Aufnahme der Referenzproben zu verwenden.

4.1.3 VALIDIERUNG DER RAMAN-ANALYSE MITTELS MÖSSBAUER-SPEKTROSKOPIE UND RÖNTGENBEUGUNG

Die Identität der Referenzen wurde mittels Mößbauer-Spektroskopie und Röntgenbeugung (XRD, engl. *X-ray diffraction*) überprüft. Die Mößbauer-Spektroskopie erlaubt eine zuverlässige Bestimmung der Eisenoxide und -hydroxide anhand der aus der Kern-Elektronen-Wechselwirkung resultierenden Hyperfeinstruktur, die im Mößbauer-Spektrum experimentell bestimmbar ist.

Die Mößbauer-Analysen von Magnetit und Maghemit wurden jeweils bei Raumtemperatur (298 K) und bei 4,2 K durchgeführt (Abbildung 4.3). Bei Raumtemperatur zeigen ihre Mößbauer-Spektren ein Spektrum mit undefinierbarem Muster (Abbildung 4.3 a und c), was die genaue Unterscheidung limitiert. Dies wird durch den Kollaps der magnetischen Hyperfeinaufspaltung verursacht, die durch superparamagnetische Nanopartikel bei Raumtemperatur hervorgerufen werden kann. Um eindeutige Aussagen zu treffen, werden die Messungen bei 4,2 K wiederholt, da sich diese Temperatur unterhalb der sog. Verwey-Temperatur befindet. Unterhalb dieser Temperatur wird nämlich die superparamagnetische Relaxation blockiert und die Ladungen damit lokalisiert [114], was dazu führt, dass die Messungen unbeeinflusst bleiben. Bei 4,2 K liefert Magnetit im Mößbauer-Spektrum zwei Sextetts der magnetischen Hyperfeinaufspaltung, die aufgrund der Isomerieverschiebung δ von Fe^{2+} - und Fe^{3+} -Ionen leicht zueinander verschoben sind (Abbildung 4.3 b und d). Erkennlich wird die Verschiebung durch das Erscheinen zweier Schultern (Hervorhebung in Abbildung 4.3 b). Diese Schultern geben den Hinweis auf die Anwesenheit von Fe^{2+} -Ionen [114].

Im Gegensatz zu Magnetit beinhaltet Maghemit nur Fe^{3+} -Ionen. Somit enthält das Mößbauer-Spektrum des Maghemits erwartungsgemäß nur ein Sextett (Abbildung 4.3 d), da eine Isomerieverschiebung δ nicht stattfindet [114].

Die Ergebnisse der Mößbauer-Spektroskopie der Ferrihydrit-NP bei Raumtemperatur und bei 4,2 K sind in Abbildungen 4.3 e und f dargestellt. Bei Raumtemperatur wurde die für Ferrihydrit typische Quadrupol-Hyperfeinaufspaltung beobachtet (Abbildung 4.3 e).

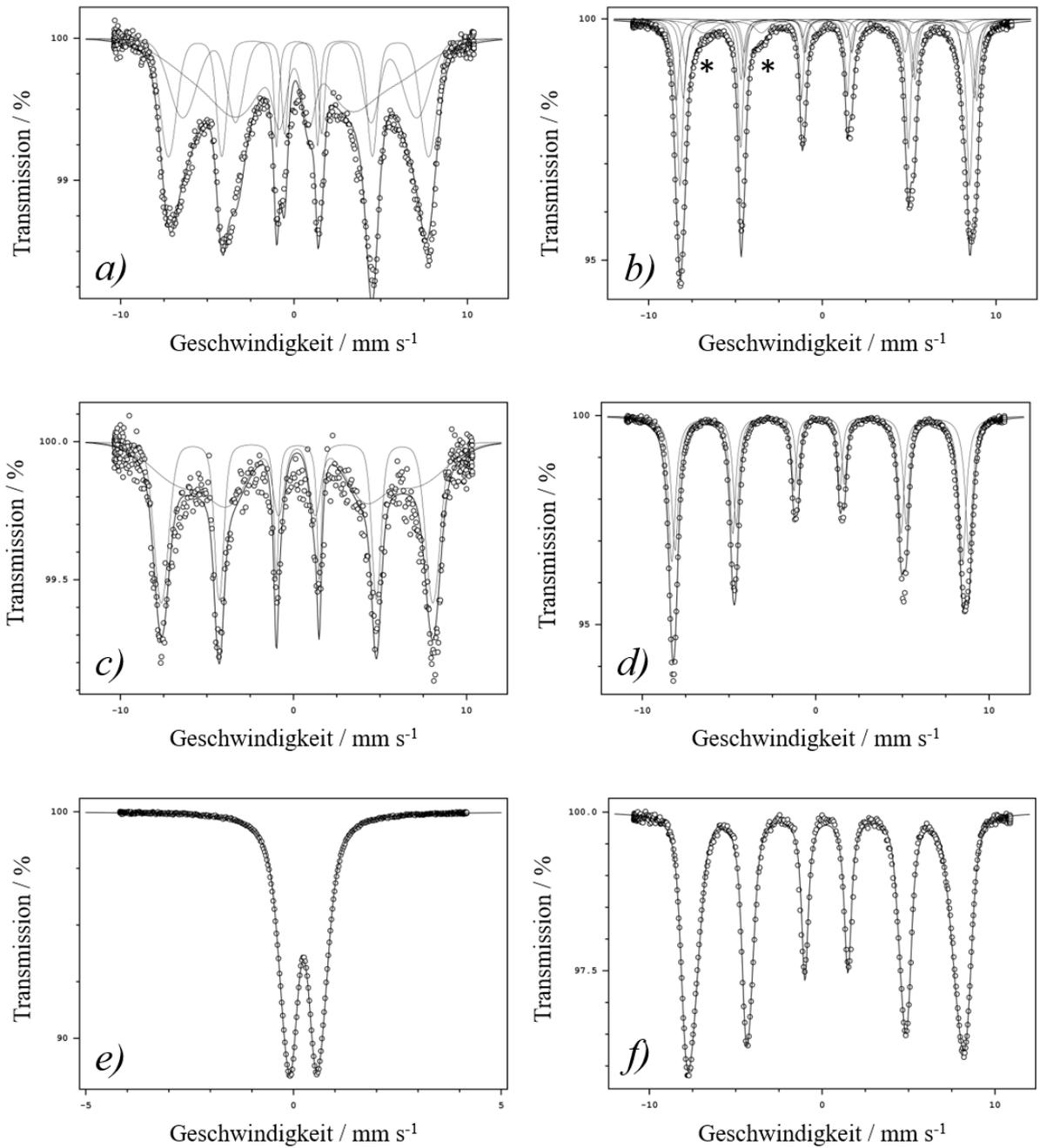


Abbildung 4.3: Mößbauer-Spektren von Magnetit (a, b), Maghemit (c, d) und Ferrihydrit (e, f) bei 298 K (a, c, e) und 4,2 K (b, d, f). Die Daten sind als kleine Kreise markiert, die Linien repräsentieren den angewendeten Kurvenfit.

Zur Identifizierung des Minerals wurden die experimentellen Daten mit einer Gauß-Normalverteilung gefittet und deren Werte mit denen aus der Literatur verglichen. Für Ferrihydrit ergab sich ein Wert von 0,72 mm/s. Dieser ist deutlich höher als die Werte für Fe^{3+} -Verbindungen, wie z.B. Goethit oder Lepidokrokit (0,5 – 0,6 mm/s) [115, 116]. Der hohe Wert zeigt an, dass die Kristallstruktur zu einem großen Maß ungeordnet ist. Das Mößbauer-Spektrum von Ferrihydrit bei 4,2 K zeigt ein Sextett, das von der magnetischen Hyperfeinaufspaltung stammt (Abbildung 4.3 f). Im Gegensatz zu Magnetit und Maghemit zeigt die Aufspaltung eine asymmetrische Verteilung in der Gauß'schen Normalverteilung, die sich durch die linkssteile und rechtschiefe Form der linksäußersten Bande bzw. rechtssteile und linksschiefe Form der rechtsäußersten Bande äußert. Die durchschnittlich ermittelten B_{HF} -Werte von 48,73 T bzw. 50,32 T entsprechen den von Murad et al. und Pollard et al. publizierten Werten [115-117]. Die Verschiebung der Ferrihydrit-NP liegt bei 0,24 mm/s.

Eine weitere Methode zur Bestimmung der Eisenoxide Magnetit und Maghemit und des Eisenhydroxids Ferrihydrit stellt die XRD dar. Die XRD-Analyse von Magnetit und Maghemit zeigen nicht unterscheidbare Diffraktogramme (Abbildungen 4.4 a und b). Dies ist mit der Ähnlichkeit ihrer Kristallstruktur zu begründen [21].

Die XRD-Analyse von Ferrihydrit ist aufgrund des geringen Grads an Kristallinität ebenfalls erschwert. Schwach kristalline Verbindungen führen zu einer starken Verbreiterung der Banden. Jedoch können aus der Anzahl der Linien Informationen über die Stufe der variablen Kristallinität von Ferrihydrit extrahiert werden. Je nach Kristallinität des Minerals befinden sich im Diffraktogramm zwei Linien für stark ungeordnetes Ferrihydrit bzw. sechs Linien für höher kristallisiertes Ferrihydrit. Das in Abbildung 4.4.c gezeigte XRD-Muster von Ferrihydrit weist zwei Banden auf. Es handelt sich demnach um schwach kristallisiertes 2-Linien-Ferrihydrit.

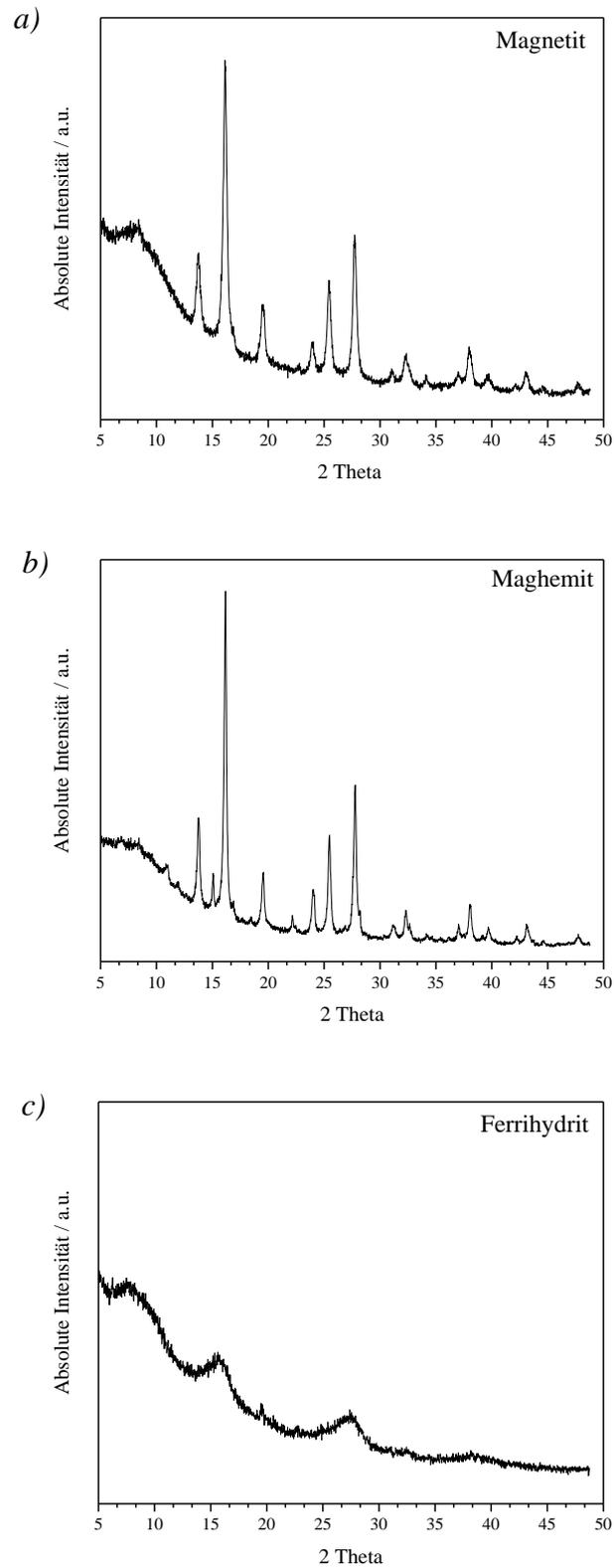


Abbildung 4.4: XRD-Messungen von Magnetit (a), Maghemit (b) und Ferrihydrit (c).

4.1.4 ZUSAMMENFASSUNG DER RAMAN-ANALYSE DER NANOPARTIKEL

Die für diese Arbeit wichtige Identifizierung des Eisenkerns von Ferritin und Magnetoferritin wird über den Vergleich mit geeigneten Raman-Referenzspektren gewährleistet. Zur Generierung geeigneter Referenz-Spektren wurden Magnetit-, Maghemit- und Ferrihydrit-NP nach Literatur-bekanntem Protokollen synthetisiert und anschließend mittels RM charakterisiert. Mittels REM-Analyse wurde die Partikelgröße der Referenzsubstanzen im erwünschten nm-Bereich bestätigt.

Das Raman-Spektrum von Magnetit zeigt eine Bande bei 665 cm^{-1} und eine schwächere bei 540 cm^{-1} . Maghemit wird mit einer breiten Bande bei 700 cm^{-1} , bestehend aus zwei Maxima und zwei mittelstarken Banden bei 370 cm^{-1} und 500 cm^{-1} , identifiziert. Das Raman-Spektrum von Ferrihydrit besitzt eine starke Bande bei 720 cm^{-1} und zwei schwache bei 350 cm^{-1} und 510 cm^{-1} .

Erste Bestätigung der Identität der ermittelten Raman-Spektren von Magnetit-, Maghemit- und Ferrihydrit-NP erfolgte durch Vergleich mit den veröffentlichten Raman-Spektren der jeweiligen Eisenverbindung. Die Raman-Signatur einer Substanz beschreibt die Form und die Intensitätsverhältnisse der Banden und die Positionen der Bandenmaxima. Vergleicht man die Raman-Signaturen der synthetisierten Magnetit-, Maghemit- und Ferrihydrit-NP mit denen aus der Literatur, konnten grundsätzlich Übereinstimmungen gefunden werden. Die Positionen der Bandenmaxima unterscheiden sich zwar bei jedem Raman-Spektrum, jedoch sind diese Abweichungen geringfügig (ca. $\pm 10\text{ cm}^{-1}$), sodass sie die Bestätigung der Identität der ermittelten Raman-Spektren der Magnetit-, Maghemit- und Ferrihydrit-Nanopartikel nicht beeinträchtigen.

Zusätzlich wurden die Raman-Daten mittels Mößbauer-Spektroskopie und XRD validiert. Insbesondere die Mößbauer-Spektroskopie erwies sich als geeignet für eine Identifizierung der Referenzsubstanzen und somit zur Bestätigung der Raman-Daten. Denn durch die experimentelle Ermittlung der hochsensitiven Hyperfeinstruktur konnten zuverlässige und akkurate Aussagen über die Qualität der Nanopartikel getroffen werden. Aufgrund der unterschiedlichen Isomerieverschiebung δ der Fe^{2+} - und Fe^{3+} -Ionen ist diese Methode besonders zur Unterscheidung von Magnetit- und Maghemit-NP geeignet.

Die XRD-Analyse dagegen erlaubte keine ausreichende Validierung der Raman-Daten. Eine Unterscheidung von Magnetit und Maghemit war aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit nicht möglich. Ebenso wenige strukturelle Informationen konnten aus dem Diffraktogramm von schwach kristallinem Ferrihydrit aufgrund der starken Linienverbreiterung gewonnen

werden. Die zwei breiten Banden gaben lediglich einen Hinweis auf 2-Linien-Ferrihydrit. Diese Form von Ferrihydrit ist erwünscht, denn aufgrund der schnellen Assemblierung der Eisenionen im Ferritinkern und der kleinen Größe (2 nm) des ungeordneten 2-Linien-Ferrihydrits [38] wird im Eisenkern von Ferritin diese Form vermutet.

Alle Referenzsubstanzen zeigen in ihren Raman-Spektren eine markante Bande im Bereich von 665 cm^{-1} bis 730 cm^{-1} , die für eine klare und zuverlässige Identifizierung des jeweiligen Minerals im Eisenkern von Ferritin und Magnetoferritin und auch in weiteren biologischen Proben infrage kommt. Die Intensität der starken Bande bei 665 cm^{-1} im Raman-Spektrum von Magnetit ist 5- bis 6-fach höher als die der schwachen Bande bei 540 cm^{-1} . Diese schwache Bande wird mit hoher Wahrscheinlichkeit von Banden, die von der biologischen Matrix stammen, überlagert oder ist gegen den hohen Fluoreszenzuntergrund nur sehr schwer bis kaum zu erkennen. Die starke Bande dagegen wird im Raman-Spektrum von Proteinen sichtbar herausstechen. Das gleiche gilt auch für Maghemit und Ferrihydrit, deren markante Bande bei 700 cm^{-1} eine 2-fach bzw. 7-fach höhere Intensität als ihre entsprechenden schwächeren Banden (Maghemit: $370\text{ cm}^{-1}/500\text{ cm}^{-1}$; Ferrihydrit: $350\text{ cm}^{-1}/510\text{ cm}^{-1}$) hat. Wobei zu erwähnen ist, dass die Intensitäten der mittelstarken Banden bei 370 cm^{-1} und 500 cm^{-1} von Maghemit ausreichend sein könnten, um im Raman-Spektrum neben den Proteinbanden identifizierbar zu sein.

Obwohl die Raman-Verschiebungen der markanten Banden nah beieinander liegen, ist es dennoch möglich die Mineralien voneinander anhand ihrer Bandenform zu unterscheiden. Das Raman-Spektrum von Magnetit zeigt nach Anregung bei allen Wellenlängen eine klare relativ schmale Bande bei 665 cm^{-1} . Die markanten Banden im Raman-Spektrum von Maghemit und Ferrihydrit sind sich sehr ähnlich. Dennoch kann Maghemit durch das Auftreten zweier Maxima in der markanten Bande bei $\lambda_0 = 532\text{ nm}$ und 785 nm oder als Plateau bei $\lambda_0 = 532\text{ nm}$ identifiziert werden. Bei Ferrihydrit zeigt diese markante Bande eine breite und glatte Form bei allen λ_0 .

4.2 RAMAN-ANALYSE VON FERRITIN

Die Abschnitte 4.2 und 4.3 machen deutlich, dass die Raman-Mikrospektroskopie für eine klare und detaillierte Charakterisierung der Mineralphase des Eisenkerns im natürlichen Ferritin (Ft) und Magnetoferritin (MFt) geeignet ist.

In Abschnitt 4.2 werden natürliches Ferritin aus der Pferdemiilz (Eq-Ft, engl. *equine spleen ferritine*) und Apoferritin aus der Pferdemiilz (Eq-ApoFt) Raman-mikrospektroskopisch miteinander verglichen. Außerdem wird über die in Abschnitt 4.1 dargestellten Raman-Referenzspektren eine Interpretation der Mineralphase des Eisenkerns in Eq-Ft durchgeführt.

4.2.1 FLUORESZENZ-PROBLEMATIK BEI DER RAMAN-ANALYSE VON FERRITIN

Ein häufig auftretendes Problem bei der Raman-Analyse von Eq-Ft ist die Fluoreszenz. Eine Erklärung hierfür könnte die rötliche Färbung der Eq-Ft-Lösung im Vergleich zur farblosen Lösung von Eq-ApoFt sein, da gefärbte Substanzen zur Fluoreszenz neigen können [118]. Die farbklare Eq-ApoFt hingegen zeigte selten einen Fluoreszenzuntergrund. Auch Molekülgruppen im Protein, Matrixbestandteile oder Verunreinigungen können Fluoreszenz verursachen.

Zur Vermeidung von Fluoreszenz gibt es verschiedene Strategien. Eine davon ist die Entfernung von Verunreinigungen, was im Rahmen dieser Arbeit mittels *Amicon*[®] Ultra-Zentrifugeneinheiten durchgeführt wurde.

Sollte es sich um eine intrinsische Fluoreszenz der Fluorophore in der Probe handeln, ist das sogenannte Photobleaching eine Option, das vor der Messung durch längeres Bestrahlen mit der Anregungsquelle angewendet wird, um die Fluorophore zu zerstören [118]. Problematisch hierbei ist, dass durch die Lichtabsorption über eine lange Zeit neben der Zerstörung der Fluorophore auch die Zerstörung der biologischen Komponenten der Probe hervorgerufen werden kann. Zusätzlich kann es zu einer Transformation der Mineralphase im Eisenkern kommen. Die Umwandlung der Eisenminerale zur thermodynamisch stabilsten Kristallphase, dem Hämatit, bei Verwendung hoher Laserleistung und langer Lichtabsorption, ist bereits in der Literatur einschlägig beschrieben [27, 119, 120]. Auch in eigenen Experimenten konnte bei Bestrahlung über einen Zeitraum von über einer Stunde eine Umwandlung des Mineralkerns von Eq-Ft zu Hämatit beobachtet werden (Abbildung A2 im Anhang). Eine Reduktion der Laserenergie würde das Risiko der thermischen Zerstörung des Proteins und eine Transformation der Eisenverbindungen zwar vermindern, jedoch erfordert dies eine deutliche Verlängerung der Integrationszeit. Dies ist bedingt durch die umgekehrte Proportionalität der Intensität des Raman Signals I zur Wellenlänge λ von $I \sim \lambda^{-4}$. Die Analyse wird damit nicht nur generell zeitaufwändiger, sondern zusätzlich wird es auch schwieriger zeitlich dynamische Proben wie biologische Substanzen zu untersuchen.

Eine elegantere Strategie zur Vermeidung von Fluoreszenz ist die Wahl der richtigen Anregungswellenlänge λ_0 . Da Fluoreszenz nur bei bestimmten Wellenlängen auftritt, kann ein Wechsel der Anregungswellenlänge λ_0 den Fluoreszenzuntergrund minimieren. Mit der Aufnahme des Fluoreszenzspektrums der zu untersuchenden Probe kann die geeignete Wellenlänge ermittelt werden. Das in Abbildung 4.5 gezeigte Spektrum wurde mit einer Anregungswellenlänge $\lambda_0 = 633$ nm und einem Notch-Filter für den Bereich von 500 nm bis 850 nm erstellt.

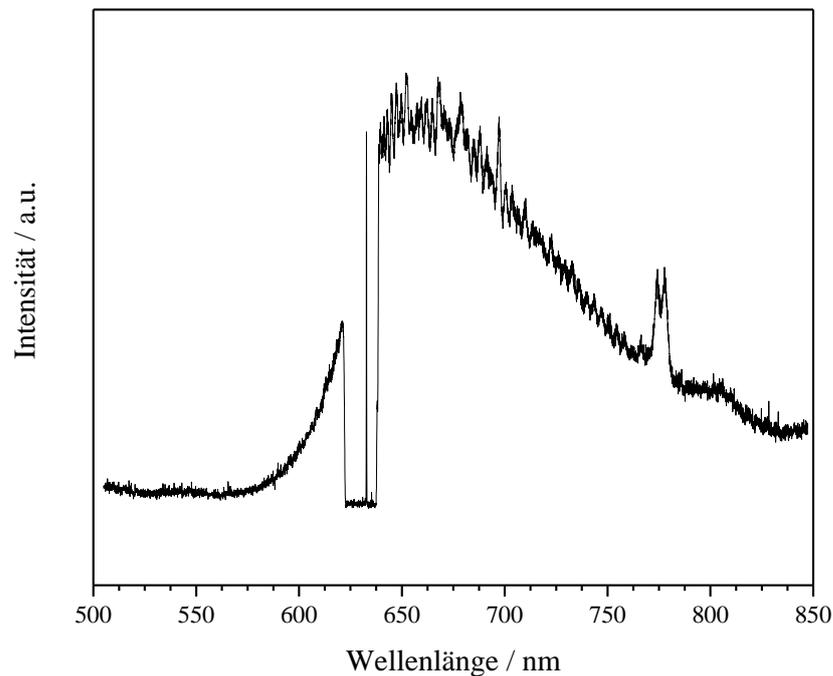


Abbildung 4.5: Fluoreszenz-Spektrum von Eq-Ft. Ein Maximum ist bei 660 nm zu erkennen. Die Spalte stammt aus dem Cut-out des Filters, das die Anti-Stokes und Stokes-Bereiche trennt.

Ein Maximum tritt bei 660 nm auf. Dies bedeutet, dass eine Anregungswellenlänge λ_0 von 633 nm für die Raman-Analyse von Ferritin ungünstig ist. Ein niedriger Fluoreszenzuntergrund im sichtbaren Bereich kann besonders unterhalb von 580 nm beobachtet werden. Im NIR-Bereich oberhalb 780 nm ist ebenfalls eine Senkung des Fluoreszenzuntergrundes erkennbar. Die Anregung mit $\lambda_0 = 532$ nm erscheint erfolgversprechend, da hier die Fluoreszenz niedrig und durch die kurze Wellenlänge die Messzeit im Vergleich zur Verwendung von 785 nm kurz ist. Für die folgende Raman-Analyse von Eq-Ft und Eq-ApoFt wird die Verwendung von $\lambda_0 = 532$ nm und auch $\lambda_0 = 785$ nm geprüft.

4.2.2 RAMAN-SPEKTRUM VON FERRITIN

In Abbildung 4.6 sind die Raman-Spektren von Eq-Ft und Eq-ApoFt zu sehen. Es wurde eine Anregungswellenlänge von $\lambda_0 = 532 \text{ nm}$ eingesetzt. Der aufgenommene spektrale Bereich erstreckt sich von $50 - 3000 \text{ cm}^{-1}$.

Ein Marker für die Präsenz der Proteine ist die Bande bei 1002 cm^{-1} [104], die aus der Ringatmung des Phenylalanins (Phe) stammt. Oberhalb von 1000 cm^{-1} treten die für Proteine charakteristischen breiten Banden auf, die Rückschlüsse auf die Konformation der Sekundärproteinstruktur, die sog. *Backbone*-Struktur, geben [100, 101, 118]. Diese Banden liegen bei 1650 cm^{-1} für die Amid I (80 % C=O-Streckschwingung) und bei $1230 - 1360 \text{ cm}^{-1}$ für Amid III (40 % C-N-Streckschwingung, 30 % N-H-Beugeschwingung) [101]. Die Positionen der Banden liefern den Hinweis auf die Beschaffenheit des Proteins aus α -Helices. Dies ist zu erwarten, da die Apoferritine zu 80 % aus dieser Sekundärproteinstruktur aufgebaut sind [8, 39, 100].

Zwei weitere und sehr ausgeprägte Banden bei 1460 cm^{-1} und bei $2800 - 3000 \text{ cm}^{-1}$ sind charakteristisch für die C-H-Deformationsschwingungen (CH *def.*) bzw. die C-H-Streckschwingungen (CH *str.*). Zwischen 1800 cm^{-1} und 2800 cm^{-1} liegt der sog. stille Bereich (engl. *silent region*), wo Proteine keine Signale produzieren [121].

Eine breite Bande mit zwei Maxima bei 1030 cm^{-1} und 1130 cm^{-1} ist besonders im Raman-Spektrum von Eq-ApoFt ausgeprägt. Die erste Bande kann Phe und die zweite Tryptophan (Trp) zugeordnet werden [99]. Unterhalb von 1000 cm^{-1} erscheinen Banden, die mit aromatischen Aminosäuren assoziiert werden können. Die Banden bei 620 cm^{-1} , 640 cm^{-1} und 750 cm^{-1} werden jeweils Phe, Tyrosin (Tyr) und Trp zugeordnet. Die sog. Tyr-Fermi-Dublette erzeugt zwei nahe beieinander liegende Banden bei 830 cm^{-1} und 850 cm^{-1} . Banden bei 415 cm^{-1} und 480 cm^{-1} können aus den Wechselwirkungen schwefelhaltiger Aminosäureseitenketten stammen, jedoch können sie auch einen anderen Ursprung haben, was im folgenden Abschnitt 4.2.3 diskutiert wird. Raman-Banden der Disulfidbrückenbindungen treten im Bereich von $500 - 550 \text{ cm}^{-1}$ auf. Dabei ist zu beachten, dass Disulfidbrückenbindungen in Ferritin und Apoferritin nicht vorkommen [100].

In Tabelle 4.2 in Abschnitt 4.3 werden die einzelnen Banden mit ihrer Zuordnung und Interpretation zusammengefasst.

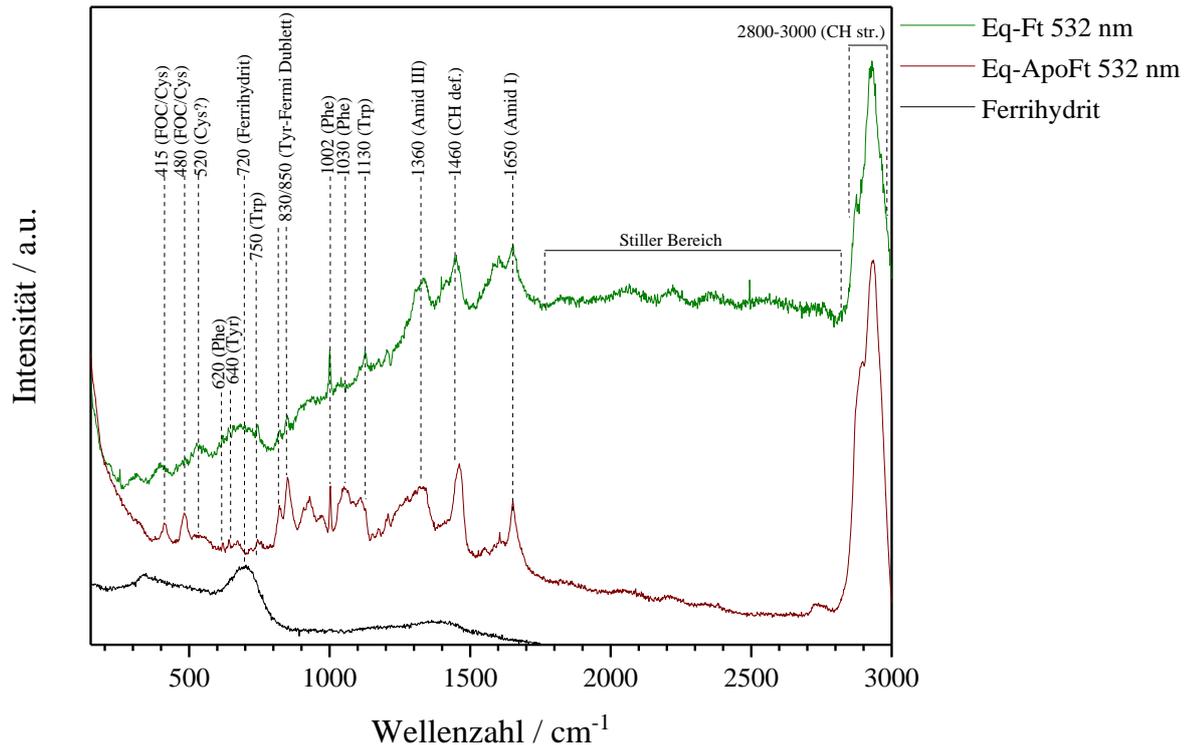


Abbildung 4.6: Raman-Spektrum von Eq-Ft und Eq-Apo-Ft, aufgenommen bei einer Anregungswellenlänge $\lambda_0 = 532 \text{ nm}$ und $100\times$ -Objektiv. Bei Eq-Ft betrug die Integrationszeit $100 \times 10 \text{ s}$ bei 10 % der maximalen Laserleistung. Bei Eq-ApoFt wurde eine Integrationszeit von $25 \times 10 \text{ s}$ gewählt.

4.2.3 RAMAN-ANALYSE DES EISENKERNS VON FERRITIN

In Abbildung 4.7 sind Raman-Spektren von Eq-Ft und Eq-ApoFt nach Anregung mit $\lambda_0 = 532 \text{ nm}$ bzw. $\lambda_0 = 785 \text{ nm}$ gezeigt.

Wie bereits erwähnt, ist die Zuordnung der Banden bei 415 cm^{-1} und 480 cm^{-1} Gegenstand fachlicher Diskussionen. In allen vier Spektren von Eq-Ft und Eq-ApoFt sind die Banden bei 415 cm^{-1} und 480 cm^{-1} erkennbar (Abbildung 4.7), wobei die Banden besonders in den Raman-Spektren von Eq-ApoFt intensiv erscheinen.

Anhand einiger Veröffentlichungen wurden diese Banden den Eisenverbindungen zugeordnet. So assoziierten beispielsweise Asthon et al., 2017, Banden in der Region $405 - 550 \text{ cm}^{-1}$ mit Fe-O und Fe-NO [109]. Solbrig et al. berichten von einer asymmetrischen Fe-O-Fe-Streckschwingung des Sauerstoff-überbrückten Fe(III)-Komplexes, deren Raman-Banden sich bei 458 cm^{-1} und 870 cm^{-1} befinden [122].

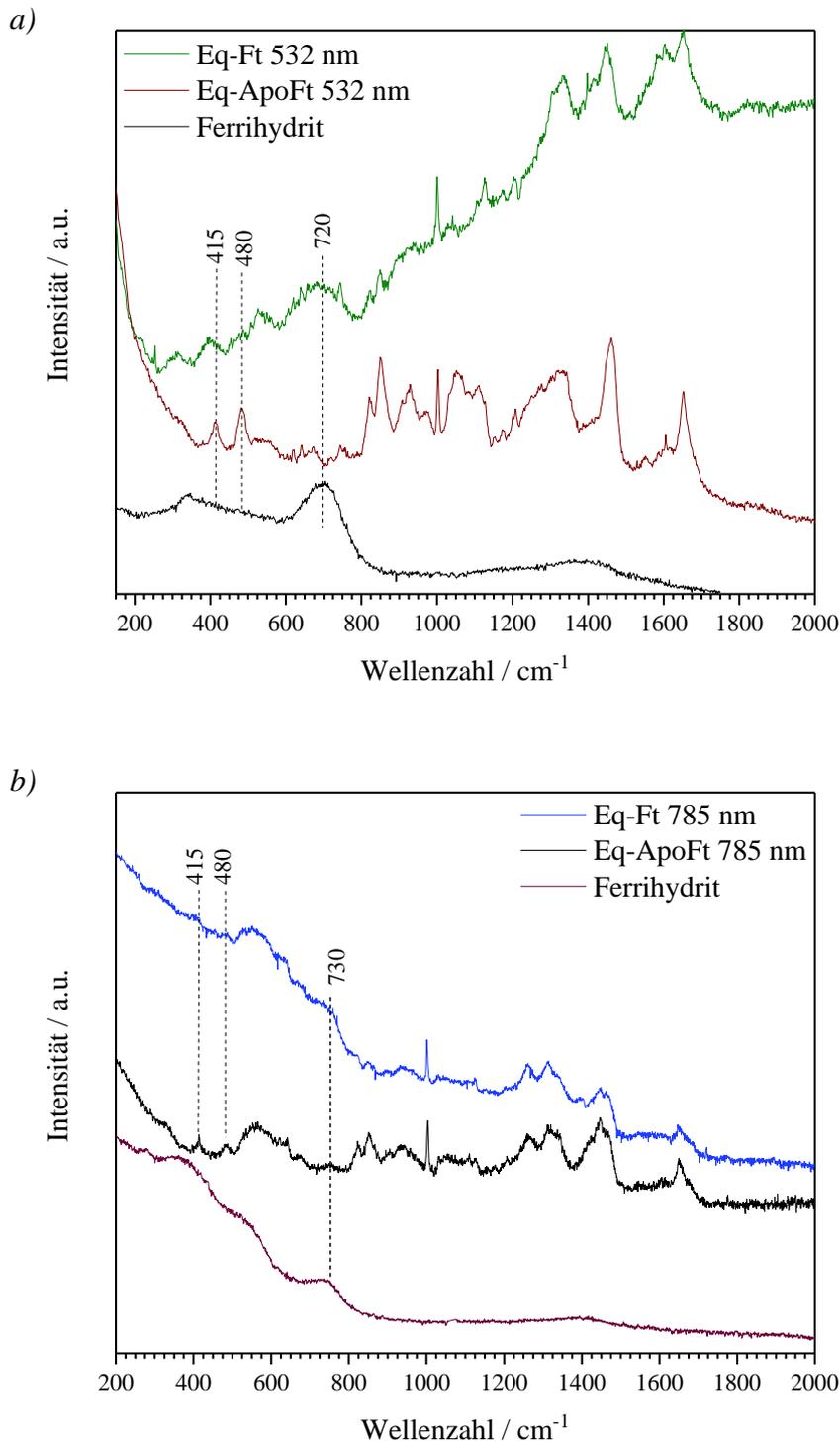


Abbildung 4.7: Raman-Spektren von Eq-Ft, Eq-ApoFt und der Referenzsubstanz Ferrihydrit, aufgenommen bei jeweils einer Anregungswellenlänge λ_0 von 532 nm (a) und 785 nm (b). Die Integrationszeit betrug jeweils 100×10 s in den Raman-Spektren von Eq-Ft (10 % der maximalen Intensität). Bei Eq-ApoFt wurde eine Integrationszeit von 25×10 s gewählt.

Plowman et al., 1984, untersuchten die symmetrischen Fe-O-Fe-Schwingungsmoden des (μ -Oxo)bis[aquobis(phenanthrolin)-eisen(III)]-Komplexes. Dabei beobachteten sie eine symmetrische Streckschwingung bei 395 cm^{-1} , die nach ^{18}O -Austausch eine Rotverschiebung um 5 cm^{-1} zeigte [123]. Wang et al., 1994, untersuchten die Häm-Koordination von NO der NO-Synthase und beobachteten eine Fe-NO-Streckschwingung bei 549 cm^{-1} im Resonanz-Raman-Spektrum [124].

Die Anwesenheit der Banden bei 415 cm^{-1} und 480 cm^{-1} im Raman-Spektrum von Eq-ApoFt wirft die Frage auf, ob diese den Eisenanteilen im Eisenkern zugeordnet werden können. Zur Bestimmung des Eisengehaltes wurde die ICP-MS verwendet. Für Eq-ApoFt ($4\text{ }\mu\text{M}$) wurde ein Eisengehalt von $541,4 \pm 5\text{ }\mu\text{g/l}$ und für Eq-Ft ($2\text{ }\mu\text{M}$) ein Eisengehalt von $111.718,7 \pm 1.110\text{ }\mu\text{g/l}$ bestimmt. Sollten die Banden bei 415 cm^{-1} und 480 cm^{-1} vorwiegend mit dem Eisenkern assoziiert sein, sollten durch die höheren Eisengehalte in Eq-Ft auch höhere Intensitäten der Raman-Signale zu erwarten sein.

Die Intensitäten der beiden Banden werden mit der Intensität der Phe-Bande bei 1002 cm^{-1} , die in allen vier Raman-Spektren von Eq-Ft und Eq-ApoFt, aufgenommen bei $\lambda_0 = 532\text{ nm}$ und 785 nm , annähernd identisch ist, verglichen. In den Raman-Spektren von Eq-ApoFt, die bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_0 = 532\text{ nm}$ und 785 nm aufgenommen wurden, zeigen die Banden bei 415 cm^{-1} und 480 cm^{-1} ein sehr ähnliches Intensitätsverhältnis mit der Phe-Bande bei 1002 cm^{-1} . Bei Eq-Ft sollte der 413-fach erhöhte Eisenanteil dieses Verhältnis erwartungsgemäß zugunsten der Banden bei 415 cm^{-1} bzw. 480 cm^{-1} verschieben. Betrachtet man das Intensitätsverhältnis der beiden Banden mit der Phe-Bande im Raman-Spektrum von Eq-Ft, jeweils nach Anregung bei $\lambda_0 = 532\text{ nm}$ und 785 nm , entspricht dieses Verhältnis annähernd dem von Eq-ApoFt. Dies wird besonders deutlich bei $\lambda_0 = 532\text{ nm}$. Bei $\lambda_0 = 785\text{ nm}$ ist die Ermittlung des Verhältnisses durch ein Überlappen der Banden durch den Fluoreszenzuntergrund leicht beeinträchtigt. Jedoch wäre durch den 413-fach erhöhten Eisenanteil für Eq-Ft eine Erhöhung der Signalintensitäten der Banden bei 415 cm^{-1} und 480 cm^{-1} zu erwarten. Diese Banden können den schwefelhaltigen Aminosäuren, die in diesem Wellenzahlenbereich Signale erzeugen, zugeordnet werden. Da diese Banden in diesem Wellenzahlenbereich auch mit Fe-O assoziiert wurden, wäre die andere Interpretationsmöglichkeit die Zuordnung dieser Banden zum Ferroxidase-Zentrum (FOC, engl. *ferroxidase center*), das sowohl in Eq-ApoFt als auch in Eq-Ft vorhanden ist. Denn FOC besitzt Asparaginsäuren oder Glutaminsäuren als Seitenketten, die als Metallbindungsstelle fungieren und mit Eisen ein Oxo-Dimer bilden.

Besonders interessant ist die Bande im Bereich von $665 - 730 \text{ cm}^{-1}$, die nur im Spektrum von Eq-Ft zu finden ist. In diesem Bereich befinden sich außerdem markante Banden der in Abschnitt 4.1 produzierten Eisenverbindungen, was darauf schließen lässt, dass diese Bande von den Eisenverbindungen des Kerns generiert wird. Tatsächlich stimmt die breite Bande bei 730 cm^{-1} durch Vergleich der Bandenform und -position von Eq-Ft mit der des Ferrihydrits überein (Abbildung 4.7). Bei Anregung mit $\lambda_0 = 785 \text{ nm}$ sorgt der Fluoreszenzuntergrund unterhalb 800 cm^{-1} für eine teilweise Überdeckung der breiten Bande im Raman-Spektrum von Eq-Ft. Dennoch tritt diese Bande bei 730 cm^{-1} in Form einer Schulter auf, deren Form und Position mit dem Referenzspektrum von Ferrihydrit ($\lambda_0 = 785 \text{ nm}$) übereinstimmt.

Die Raman-Daten deuten daher darauf hin, dass die Bande bei 700 cm^{-1} mit den Eisenverbindungen des Eisenkerns assoziiert werden kann und dass der Eisenkern von Eq-Ft aus Ferrihydrit-ähnlichem Material besteht.

4.2.4 VALIDIERUNG DER RAMAN-ANALYSE MITTELS MÖSSBAUER-SPEKTROSKOPIE UND RÖNTGENBEUGUNG

Mit Hilfe der Mößbauer Spektroskopie wurde versucht den Aufbau des Eisenkerns von Eq-Ft aus Ferrihydrit-ähnlichem Mineral zu bestätigen. Da es sich bei Eq-Ft um eine Flüssigkeit handelt, wurden aussagekräftige Mößbauer-Spektren nur bei niedrigen Temperaturen erreicht. Flüssige Proben liefern bei Raumtemperatur (298 K) ein Spektrum mit undefinierbarem Muster aufgrund der auftretenden Fluktuationen. In Abbildung 4.8 ist das gemessene Spektrum bei einer Temperatur von 4,2 K gezeigt.

Bei 4,2 K zeigt Ferritin ein Sextett in der magnetischen Hyperfeinaufspaltung. Dieses Sextett hat eine ähnliche asymmetrische Gaußverteilung wie Ferrihydrit, mit 48,6 T und 50,4 T auch ähnliche B_{HF} -Werte und zusätzlich dieselbe Verschiebung mit 0,24 mm/s. Das Mößbauer-Spektrum von Eq-Ft zeigt zudem übereinstimmende Ähnlichkeiten zu dem von Papaefthymiou veröffentlichten Mößbauer-Spektrum. In dieser Studie wurden die magnetischen Eigenschaften und Mößbauer-Effekte des Eisenkerns in Ferritin untersucht [125].

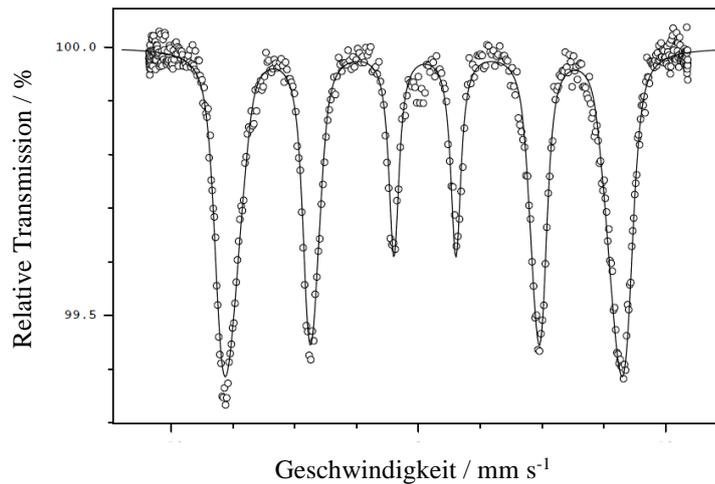


Abbildung 4.8: Mößbauer-Spektrum von Eq-Ft bei 4,2 K.

Eine detaillierte Charakterisierung des Eq-Ft konnte mittels XRD nicht erreicht werden. Zur XRD-Analyse von Eq-Ft sind solide pulverförmige Substanzen nötig. Daher wurde die Eq-Ft-Lösung vor der Messung gefriergetrocknet. Diese Anwendung ist kritisch, da Veränderungen der Probe während des Gefrier Trocknung-Vorgangs nicht ausgeschlossen werden können. In Abbildung A3 im Anhang ist das XRD-Spektrum von gefriergetrocknetem Eq-Ft gezeigt. Es zeigt sich, dass auch die lyophilisierten Protein-Komponenten Signale liefern, die die Messung stören. Eine vorangehende Entfernung der Proteinhülle ist ebenfalls kritisch, da die Eisenkerne aufgrund ihrer kleinen Größe (8 nm) und dem daraus resultierenden hohen Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis leicht chemischen Veränderungen unterworfen sein können.

4.2.5 FAZIT DER RAMAN-SPEKTROSKOPISCHEN ANALYSE VON FERRITIN

Die Eq-Ft- und Eq-ApoFt-Proben wurden jeweils bei einer Laserwellenlänge λ_0 von 532 nm and 785 nm aufgenommen. Generell sind bei der Raman-Analyse von biologischen Proben meist höhere Laserwellenlängen wie z.B. 785 nm bevorzugt, da diese in der Regel im NIR-Bereich eine nur (sehr) schwache Fluoreszenz aufweisen [118]. Für diese Arbeit war allerdings die Verwendung einer Anregungswellenlänge λ_0 von 532 nm vorteilhafter. Bereits bei der Aufnahme des Fluoreszenzspektrums konnte gezeigt werden, dass bei Eq-Ft-Proben mit Wellenlängen unterhalb von 580 nm kaum Fluoreszenz auftritt.

Proteine bestehen aus verschiedenen Aminosäuren und Molekülgruppen und somit ist ein komplexes bandenreiches Spektrum zu erwarten. Dennoch ist es möglich aus ihren charakteristischen Banden Informationen zu extrahieren. Eine Unterscheidung von Eq-Ft und Eq-ApoFt ist aufgrund einer zusätzlichen Bande bei 700 cm^{-1} , die dem Eisenkern von Eq-Ft zugeordnet werden kann, möglich. Da diese Bande sich im Raman-Spektrum von Eq-Ft befindet und nicht in dem von Eq-ApoFt, kann die Zuordnung dieser Bande zum Eisenkern bekräftigt werden. Im Spektrum mit der niedrigeren Anregungswellenlänge (532 nm) ist diese Bande gut zu erkennen. Im Spektrum mit der längeren Anregungswellenlänge (785 nm) ist sie hingegen nur als eine kleine Schulter erkenntlich. Dennoch stimmen die Bandenposition bei 730 cm^{-1} und ihre Form in den Raman-Spektren von Eq-Ft mit denen des Referenzspektrums von Ferrihydrit bei entsprechend gleicher Anregungswellenlänge λ_0 überein. Damit kann schlussgefolgert werden, dass der Eisenkern von Eq-Ft aus Ferrihydrit-ähnlichem Material aufgebaut ist.

4.3 RAMAN-ANALYSE VON MAGNETOFERRITIN

Das im Rahmen des IGSSE-Forschungsprojektes BIOMAG gesetzte Ziel ist die Entwicklung von Magnetoferritin (MfT), z.B. als Kontrastmittel für die MRT bzw. als Hilfsmittel zur magnetischen Manipulation der Zellen. Die MfT-Proben wurden von den Projektpartnern des *Institute of Biological Imaging* (IBMI) für die Charakterisierung der Eisenspezies im Kern bereitgestellt. Zur Synthese von MfT wurde rekombinant hergestelltes Apoferritin (rApoFt) hergenommen. Diese Synthese basiert auf der Inkorporation des superparamagnetischen Eisenkerns in rApoFt durch schrittweise Addition von Fe^{2+} unter Luftausschluss. Nach der erfolgreichen Charakterisierung und dem Nachweis des Verbleibs der Eisenverbindungen innerhalb des rApoFt mittels Methoden wie SDS-PAGE, erfolgt die Ermittlung der Eisenspezies mittels RM.

4.3.1 RAMAN-SPEKTRUM VON MAGNETOFERRITIN

In Abbildung 4.9 sind die Raman-Spektren von MfT, die zugehörigen Referenzspektren sowie das Spektrum von rApoFt dargestellt. In den Raman-Spektren, aufgenommen bei $\lambda_0 = 785\text{ nm}$, von MfT und rApoFt treten die gleichen Banden auf wie in den Raman-Spektren von Eq-Ft und Eq-ApoFt (Tabelle 4.2).

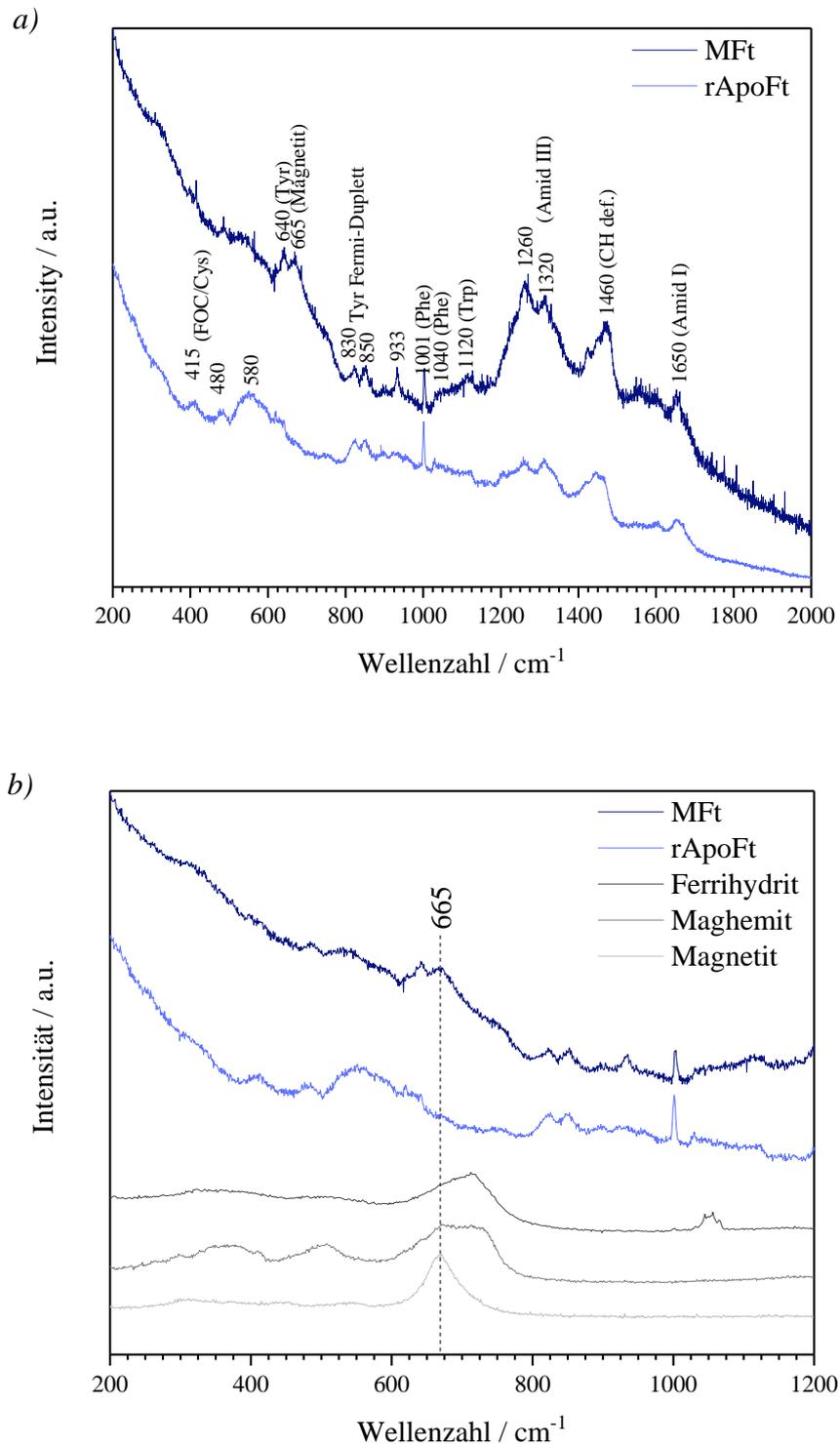


Abbildung 4.9: Raman-Spektren von MFt und rApoFt. Die Spektren wurden mit einer 100-fach akkumulierten (für MFt) und 25-fach akkumulierten (für rApoFt) Integrationszeit von 10 s bei einer Wellenlänge von $\lambda_0 = 785 \text{ nm}$ aufgenommen, mit einem 100 \times -Objektiv und einem optischen Abschwächer von 10 % (a). Vergrößerte Ansicht des Raman-Spektrums von MFt und der Referenzspektren von Ferrihydrit, Magnetit und Maghemit im Wellenzahlbereich von 200 – 1200 cm^{-1} (b).

Sehr eindeutig ist die Phe-Ringatmungsbande bei 1001 cm^{-1} . Amid I- und III-Banden treten bei 1650 cm^{-1} und $1260 - 1320\text{ cm}^{-1}$ auf, deren Positionen charakteristisch für die Sekundärstruktur der α -Helix sind. Die zwei Maxima bei 1040 cm^{-1} und 1120 cm^{-1} können mit Phe bzw. Trp assoziiert werden. Die Banden bei 640 cm^{-1} werden dem Tyr zugeordnet und das der Tyr-Fermi-Dublette zugehörige Bandenpaar liegt bei 830 cm^{-1} und 850 cm^{-1} . Ebenfalls gut erkenntlich im Raman-Spektrum von rApoFt und schwach im Raman-Spektrum von MFt sind die im Abschnitt 4.2. diskutierten Banden bei 415 cm^{-1} und 480 cm^{-1} . Diese können entweder den schwefelhaltigen Aminosäureresten oder dem Katalysezentrum FOC zugeordnet werden.

Wie im Raman-Spektrum von Eq-Ft, tritt auch eine zusätzliche Bande im Raman-Spektrum von MFt mit einem Maximum bei 665 cm^{-1} auf (siehe vergrößerte Darstellung in Abbildung 4.9 b). Diese Bande ist nicht im Raman-Spektrum von rApoFt zu verzeichnen. Anders als bei Eq-Ft ähneln die Bandenposition und -form denen von Magnetit stark. Somit kann schlussgefolgert werden, dass die chemische und strukturelle Zusammensetzung des Eisenkerns von MFt aus diesem Mineral besteht.

In Tabelle 4.2 werden alle Bandenpositionen der Raman-Spektren von Eq-Ft, Eq-ApoFt, MFt und rApoFt, aufgenommen bei einer Anregungswellenlänge $\lambda_0 = 785\text{ nm}$, dargestellt, um ihre Ähnlichkeiten der Maxima der Bandenpositionen, die von Proteinen stammen, zu demonstrieren. Eine zusätzliche Bande bei 720 cm^{-1} im Raman-Spektrum von Eq-Ft, die nicht im Raman-Spektrum von Eq-ApoFt zu erkennen ist, liefert Ferrihydrit. Im Raman-Spektrum von MFt befindet sich die Magnetit-Bande bei 665 cm^{-1} .

Für eine Aufnahme der Spektren von MFt war im Gegensatz zu Eq-Ft die Anregungswellenlänge $\lambda_0 = 785\text{ nm}$ vorteilhafter. Die Verwendung $\lambda_0 = 532\text{ nm}$ führte häufig zu Verbrennungen bzw. zeigte einen höheren Fluoreszenzuntergrund (Abbildung 4.10). Die in Abbildung 4.10 gezeigten Raman-Spektren von MFT und rApoFt, aufgenommen bei $\lambda_0 = 532\text{ nm}$, zeigen einige für Proteine charakteristische Banden. Diese sind die Phe-Bande bei etwa 1000 cm^{-1} , sowie die Amid I- und III-Bande bei 1650 cm^{-1} bzw. 1340 cm^{-1} . Weitere Banden von Proteinen sind möglicherweise vom Fluoreszenzuntergrund überdeckt.

Neben den Proteinbanden sind drei weitere breite Banden bei etwa 350 cm^{-1} , 500 cm^{-1} und 700 cm^{-1} zu sehen. Die breite Bande bei 700 cm^{-1} beinhaltet zusätzlich eine Schulter bei 665 cm^{-1} . Die Schulter, sowie die drei breiten Banden weisen auch große Ähnlichkeit mit dem Referenzspektrum von Maghemit auf.

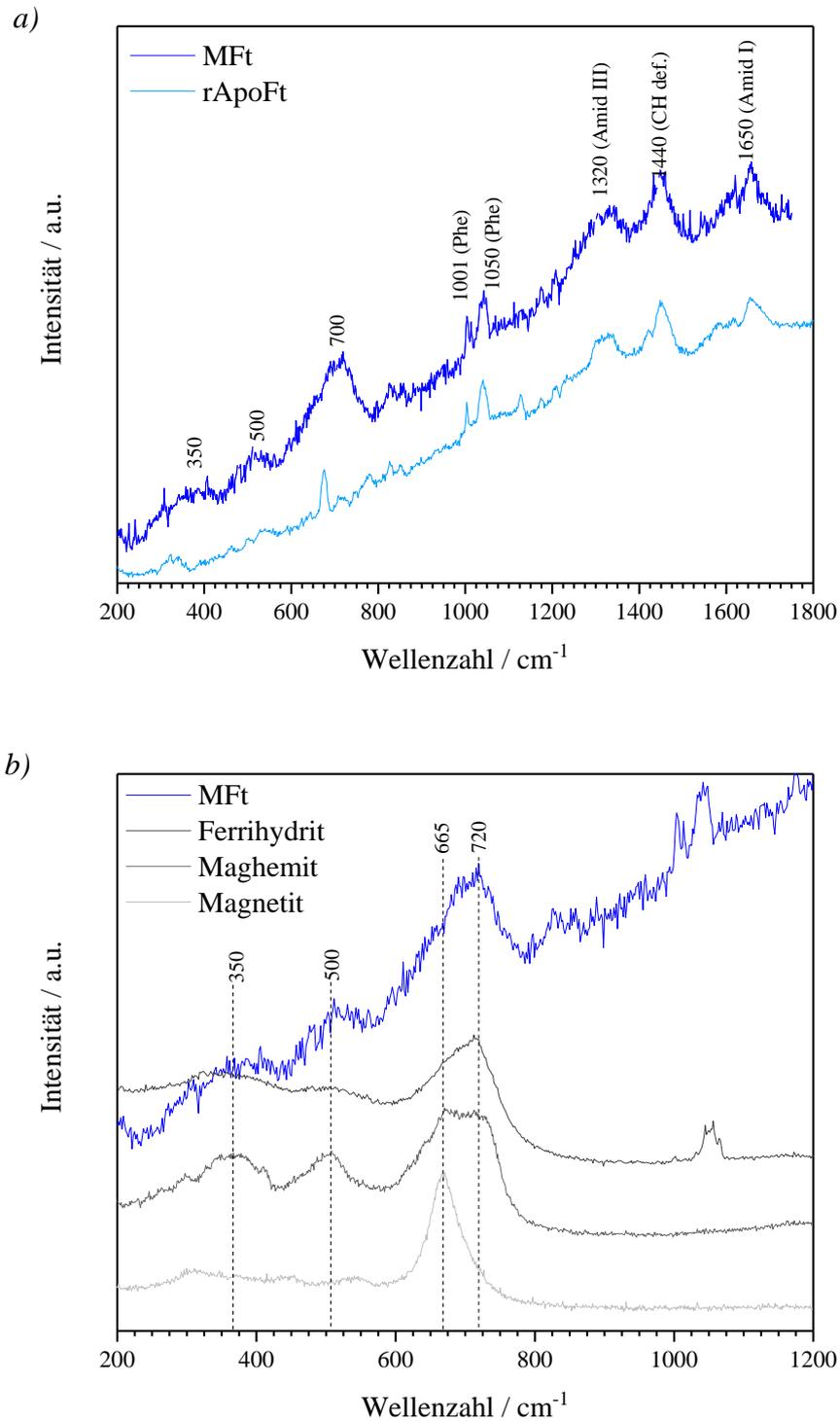


Abbildung 4.10: Raman-Spektrum von MFt und rApoFt. Das Raman-Spektrum von MFt wurde bei einer Anregungswellenlänge λ_0 von 532 nm, 10 % der maximalen Laserleistung und einem Objektiv mit 100 \times Vergrößerung aufgenommen. Bei MFt betrug die Integrationszeit 10 s bei 100 Akkumulationen. Für rApoFt wurde eine Akkumulation von 25 gewählt (a). Vergrößerte Ansicht des Raman-Spektrums von MFt mit den Referenzspektren von Ferrihydrit, Magnetit und Maghemit im Wellenzahlbereich von 200 – 1200 cm^{-1} (b).

Die Banden bei 350 cm⁻¹ und 500 cm⁻¹ zeigen nahezu gleiche Intensität. Die breite Bande bei 700 cm⁻¹ besitzt zwei Maxima bei 665 cm⁻¹ und 720 cm⁻¹, die über ein schiefes Plateau miteinander verbunden sind. Damit kann geschlossen werden, dass der Eisenkern vorwiegend aus Maghemit besteht.

Da die Raman-Spektren von Ferrihydrit und Maghemit sehr ähnlich sind, ist nicht auszuschließen, dass sich auch Teile von Ferrihydrit im Eisenkern befinden. Auch die Existenz aller drei Eisenverbindungen Ferrihydrit, Maghemit und Magnetit ist vorstellbar.

Tabelle 4.2: Bandenpositionen und die Zuordnung im Wellenzahlbereich von 400 – 2000 cm⁻¹ der Raman-Spektren von Eq-Ft/eq-ApoFt und MFt/rApoFt, zusammengefasst, aufgenommen bei $\lambda_0 = 785$ nm.

Eq-Ft/eq-ApoFt	MFt/rApoFt	Bandenzuordnung
415	415	FOC/Cys?
480	480	FOC/Cys?
520	580	schwefelhaltige As?
620	-	Phe
640	640	Tyr
-	665 (nur MFt)	Magnetit
720 (nur Eq-Ft)	-	Ferrihydrit
750	-	Trp
830/850	830/850	Tyr-Fermi-Dublett
-	933	
1002	1001	Phe (Ringatmung)
1030	1040	Phe
1130	1120	Trp
1360	1260 – 1320	Amid III
1460	1460	CH def.
1650	1650	Amid I

4.3.2 ANSÄTZE ZUR VERBESSERUNG DER RAMAN-ANALYSE VON MAGNETOFERRITIN

Die Raman-Spektren aus Abbildung 4.9 und 4.10 ermöglichen bereits einige wichtige Rückschlüsse. Breite Banden und ein erhöhter Basislinienuntergrund wie in Abb. 4.10 sind jedoch anfällig für Fehlinterpretationen. Es können beispielsweise für die Interpretation des Spektrums wichtige Banden leicht überdeckt werden.

Unabhängig davon, ob für die Analyse eine Anregungswellenlänge von $\lambda_0 = 785$ nm oder $\lambda_0 = 532$ nm eingesetzt wurde, um ein Raman-Spektrum mit möglichst schmalen Banden zu

erhalten, hat sich besonders die Anwendung langer Messzeiten und geringer Laserleistung bewährt. Eine Verkürzung der Messzeit würde durch Anwendung hoher Laserleistungen ermöglicht werden. Jedoch bergen hohe Laserleistungen das Potential der Probenzerstörung und der Transformation des Eisenkerns, was durch lange Messzeiten noch verstärkt wird. Die Anwendung kurzer Messzeiten und hoher Laserleistung (ab 25 % der maximalen Laserleistung), führten zu einer raschen Verbrennung der Probe. Erst bei 10 % der maximalen Laserleistung wurde eine zerstörungsfreie Analyse über einen längeren Zeitraum erreicht. Mit noch geringerer Laserleistung (< 10 %) würde sich die Messzeit extrem erhöhen. Dieser Ansatz wurde daher nicht weiter verfolgt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Verbesserung der Raman-Analyse von MfT verschiedene Parameter optimiert und unterschiedliche Messmodi getestet, um einen optimalen Kompromiss zwischen geringer Messzeit und hohem Signal-zu-Rauschen-Verhältnis zu finden.

Ein vom einfachen Einzelspektrum einer Punktmessung zu unterscheidender Messmodus ist der sog. *DuoScan*. Diese Funktionalität des *LabRAM HR* bewegt mit Hilfe von Spiegeln den Laserstrahl sehr exakt über einen kleinen definierten Bereich ($1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$). Dadurch wird die Laserleistung über diesen Bereich verteilt, was die Spitzenbelastung für einzelne Ft- und MfT-Partikel reduziert. Dies ermöglicht es somit höhere Laserleistungen einzusetzen. Zudem wird die untersuchte Fläche spektroskopisch abgerastert, bis Signale der gesuchten Verbindung gefunden werden, da Ft- und MfT-Einzelpartikel mit einem Licht-Mikroskop nicht zu erkennen sind. 10 % der maximalen Laserleistung wurden für eine normale Einzelpunktmessung eingesetzt. Werden 10 % der maximalen Laserleistung im *DuoScan* eingesetzt, wird mit einer Punktmessung ein Spektrum mit besserem Signal-zu-Rauschen-Verhältnis erzielt (Abbildung A4 im Anhang). Die nächsthöhere in *LabRAM HR* inkludierte Stufe der optischen Abschwächer ist 25 %. Diese führt jedoch auch bei Verwendung des *DuoScan* zur Zerstörung der Probe.

Eine weitere Strategie ist die Entfernung der Proteinhülle vor der Messung. Hierbei wird jedoch die Intention der RM als zerstörungsfreie Analyse aufgegeben. Zusätzlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass die mit einer Größe von 8 nm sehr beweglichen Eisen-Nanopartikel agglomerieren oder noch leichter durch die einfallende Laserstrahlung transformiert werden. Die in Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Raman-Analyse der Eisenkern-Pellets zeigte neben Banden von Magnetit auch Banden von Goethit und Lepidokrokit. Letztere sind mit Sicherheit durch laser-induzierte Transformation entstanden (Abbildung A5 im Anhang).

Eine dritte Möglichkeit für eine Optimierung der Raman-Analyse ist die möglichst realitätsnahe Messung mittels eines Wasserimmersionsobjektivs, das in die native Umgebung des Proteins taucht und somit analysiert. Der vorhandene störende Puffer wurde vor jeder Messung mittels *Amicon*[®]*Ultra*-Zentrifugeneinheiten entfernt. Der verbleibende Rückstand wurde in Wasser resuspendiert. Ein Vorteil ist der mögliche Einsatz hoher Laserleistung, da Wasser einen großen Teil der Energie absorbiert und somit die Zerstörung des Proteins verhindern kann. Es konnten jedoch keine auswertbaren Raman-Spektren mit zufriedenstellendem Signal-zu-Rauschen-Verhältnis erhalten werden. Dies liegt zum einem vermutlich daran, dass biologische Proben sehr beweglich sind und damit schwer zu erfassen sind, insbesondere bei erforderlichen langen Messzeiten. Für eine zuverlässige Analyse ist daher eine Fixierung angebracht. Zum anderen kann der relativ geringe Gehalt an Eisen im Vergleich zum benötigten Wasservolumen eine Ursache für ein nicht aussagekräftiges Spektrum zur Eisenkern-Analyse darstellen (Abbildung A6 im Anhang).

Erfolgreich war dagegen die Raman-Analyse des Eisenkerns von Ferritin, wenn dessen Konzentration möglichst hoch war. Dies konnte erreicht werden, indem 1 µl der Probe auf einem Aluminium-Glasträger angetrocknet wurde. EDX-Aufnahmen zeigten, dass am Rand des Tropfens Element-Signale von Eisen, Kohlenstoff, Sauerstoff, Phosphor und Stickstoff auftraten, während im Inneren des Tropfens das Eisen fehlte (Abbildung A7 im Anhang). Dies lässt darauf schließen, dass sich die Ferritinproben am Rand des Tropfens anreichern. Mittels Raman-Analyse konnten schließlich die in Abbildung 4.9 und 4.10 gezeigten Spektren generiert werden.

Abgesehen von der Anwendung langer Messzeiten und Antrocknen der Probe auf einem Aluminium-Glasträger, konnte mit keiner der erwähnten Strategien ein zufriedenstellendes Raman-Spektrum der gesuchten Verbindungen gemessen werden. Eine deutliche Verbesserung der Raman-Analyse von MFt wurde durch den Wechsel der am IBMI durchgeführten Aufreinigung mittels Dialyse (Abbildung 4.10) zur SEC erreicht (Abbildung 4.9 und 4.11). Die Ergebnisse der Raman-Analyse der mittels SEC aufgereinigten Proben zeigen ein vermehrtes Auftreten von Banden und Senkung des Fluoreszenzuntergrundes.

Die Raman-Analyse von MFt, wie in Abbildung 4.11 dargestellt, zeigt auch, dass die SEC-aufgereinigte Probe eine höhere Suszeptibilität zur Veränderung der Proteinstruktur besitzt. Dies macht sich durch das Erscheinen der Phe-Bande bei 1000 cm⁻¹ im Raman-Spektrum von MFt bemerkbar. Diese ist mehr (Abbildung 4.9.) oder weniger (Abbildung 4.11) ausgeprägt vorhanden.

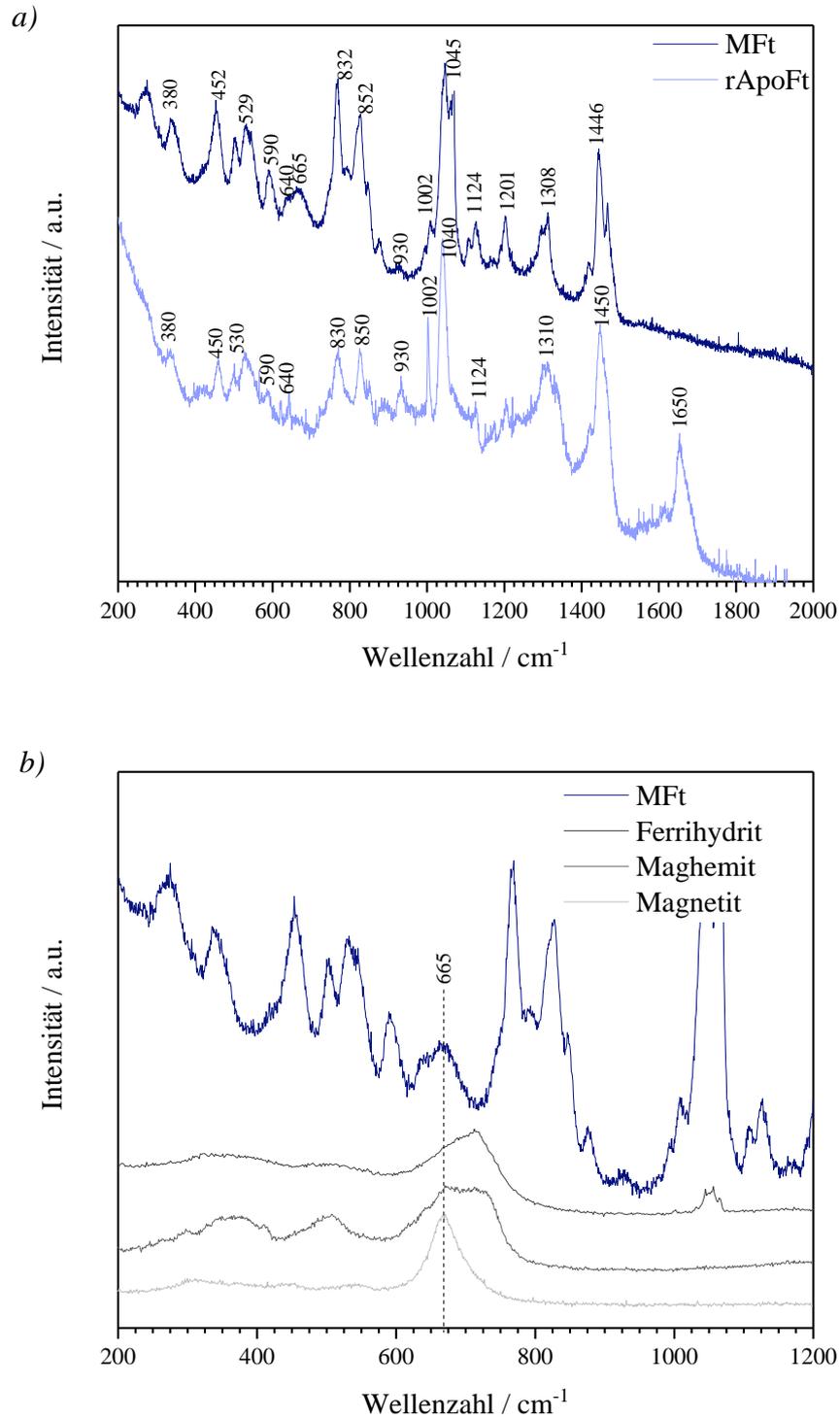


Abbildung 4.11: Raman-Spektrum von MFt und rApoFt nach SEC-Aufreinigung. Die Raman-Spektren wurden bei einer Anregungswellenlänge $\lambda_0 = 785 \text{ nm}$, einem optischen Abschwächer von 10 % und einem Objektiv mit $100\times$ Vergrößerung aufgenommen. Die Integrationszeit betrug $100 \times 10 \text{ s}$ für MFt und $25 \times 10 \text{ s}$ für rApoFt (a). Vergrößerte Ansicht des Raman-Spektrums von MFt mit den Referenzspektren von Ferrihydrit, Magnetit und Maghemit im Wellenzahlbereich von $200 - 1200 \text{ cm}^{-1}$ (b).

Ein schwaches Auftreten der Phe-Bande im Raman-Spektrum von MFt, wie in Abbildung 4.11 gezeigt, ist ein Anzeichen dafür, dass eine partielle Denaturierung des Proteins stattgefunden haben könnte. Weitere Anzeichen der Denaturierung des Proteins kann das Verschwinden der Amid I-Bande bei 1650 cm^{-1} im Raman-Spektrum von MFt (Abbildung 4.11) sein. Die Unterschiede der Raman-Spektren in Abbildung 4.9 und 4.11 könnten womöglich durch minimal veränderte Parameter bei der Aufreinigung mittels SEC wie z.B. Konzentration des Puffers, oder auch durch laserinduzierte Veränderung während der Raman-Analyse verursacht sein.

4.3.3 FAZIT AUS DER RAMAN-SPEKTROSKOPISCHEN ANALYSE DES EISENKERNS VON MAGNETOFERRITIN

Die Charakterisierung des Eisenkerns von Eq-Ft mittels RM zeigte, dass dieser aus Ferrihydrit besteht. In den vom IBMI zur Verfügung gestellten Magnetoferritin-Proben konnte Raman-mikrospektroskopisch Magnetit nachgewiesen werden.

Die Ermittlung geeigneter Messmodi für die Optimierung der Raman-Analyse des Eisenkerns gestaltete sich als schwierig. Im Rahmen des Projektes wurde einerseits die Herstellung von MFt und die Probenaufbereitung am IBMI kontinuierlich verbessert, andererseits auch parallel verschiedene Parameter der Raman-Analyse variiert, um ein möglichst optimales Signal-zu-Rauschen-Verhältnis zu erzielen. Durch die Veränderung der vom IBMI bereitgestellten Proteinproben konnte nur bedingt ein eindeutiger Zusammenhang zwischen den optimierten Raman-Parametern und den erhaltenden Raman-Spektren der Probe erstellt werden. Bewährt hat sich die Anwendung niedriger Laserleistung und langer Messzeiten für die Raman-Spektren mit ausreichendem Signal-zu-Rauschen-Verhältnis. Das Ziel, die Messzeit, zu verkürzen, war auch aufgrund der Tendenz zur Fluoreszenz von MFt schwer zu erreichen, genauso wie bei der Raman-Analyse von Eq-Ft. Denn lange Bestrahlungszeiten werden generell angewendet, um die Fluoreszenz durch die Zerstörung der Fluorophore zu vermindern. Hohe Laserleistungen, um die Messzeiten zu verkürzen, führten dagegen zu einer Zerstörung der Probe durch laserinduzierte Hitze. Dieser Ansatz konnte lediglich bei Eq-ApoFt und rApoFt angewendet werden, da diese eine enorme Hitzestabilität und eine niedrige Tendenz zur Fluoreszenz zeigten.

Für eine optimale Raman-Analyse des Eisenkerns sind neben langer Messzeit auch hohe Konzentrationen der Eisenverbindungen notwendig. Dies wurde erstens erreicht, indem

mittels *Amicon*[®] Ultra-Zentrifugeneinheiten Matrixbestandteile wie z.B. Puffersubstanzen entfernt wurden, um das Konzentrationsverhältnis von Eisen zur Matrix zu erhöhen. Zweitens führte ein Antrocknen der Probe auf einem Aluminium-Glasträger zu einer Anreicherung des Proteins am Rand des Tropfens. An diesen Stellen konnten aussagekräftige Raman-Spektren von MFt und auch Eq-Ft generiert werden. Wesentlich zur Verbesserung der Raman-Analyse hat allerdings die am IBMI durchgeführte Aufreinigung mittels SEC beigetragen. Mit dieser Aufreinigungsmethode sind sowohl die verschiedenen Protein-charakteristischen Banden wie auch die Magnetit-Bande bei 665 cm^{-1} klar zu erkennen und der Fluoreszenzuntergrund konnte reduziert werden.

4.4 EINSCHLUSS VON FERRITIN UND MAGNETOFERRITIN IN LYSOSOMEN

Nachdem die Charakterisierung der Eisenspezies des Eisenkerns in Ferritin (Ft) und MFt mittels RM erfolgreich durchgeführt werden konnte, wurde untersucht, inwiefern ihre Charakterisierung nach Einschluss in weiteren Zellen mittels RM möglich ist. Denn durch die Erhöhung der Proteinvialität in der Probe nimmt wiederum die Komplexität des Raman-Spektrums zu. Zu Beginn der Untersuchung erfolgt der Einschluss von Ft und MFt in Lysosomen. Lysosomen sind Zellbestandteile in eukaryotischen Zellen und sind aus einer einfachen Biomembran aufgebaut, die Transportproteine enthält [126].

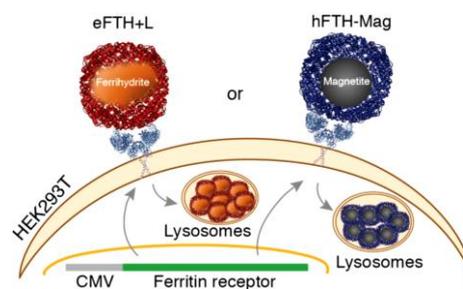


Abbildung 4.12: Schematische Darstellung des Transportes von Eq-Ft (in Abbildung eFTH+L) und MFt (in Abbildung hFTH+Mag) über genetisch kodierte Rezeptoren in lysosomale Kompartimente. Aus Massner et al., 2018 [9].

Am IBMI wurde ein semi-genetisches System zur Aufnahme von biosynthetischen Nanopartikeln wie Ft und MFt entwickelt. Dieses besteht aus genetisch kodierten Ferritin-

Rezeptoren wie Tim-2, TfR1, YFP und Scara5, über die selektiv antiferromagnetisches Eq-Ft oder superparamagnetisches MFt zu lysosomalen Kompartimenten in Lysosomen eingeschlossen werden (Abbildung 4.12) [9].

4.4.1 RAMAN-ANALYSE VON LYSOSOMALEM FERRITIN UND MAGNETOFERRITIN

Die Einlagerung der MFt in die lysosomalen Kompartimente wurde mit Hilfe genetisch kodierter Rezeptoren unterstützt. In Abbildung 4.13 werden die Raman-Spektren von mit Ft und MFt beladenen Lysosomen sowie eine Negativkontrolle, die dem unbeladenen Lysosom entspricht, miteinander verglichen.

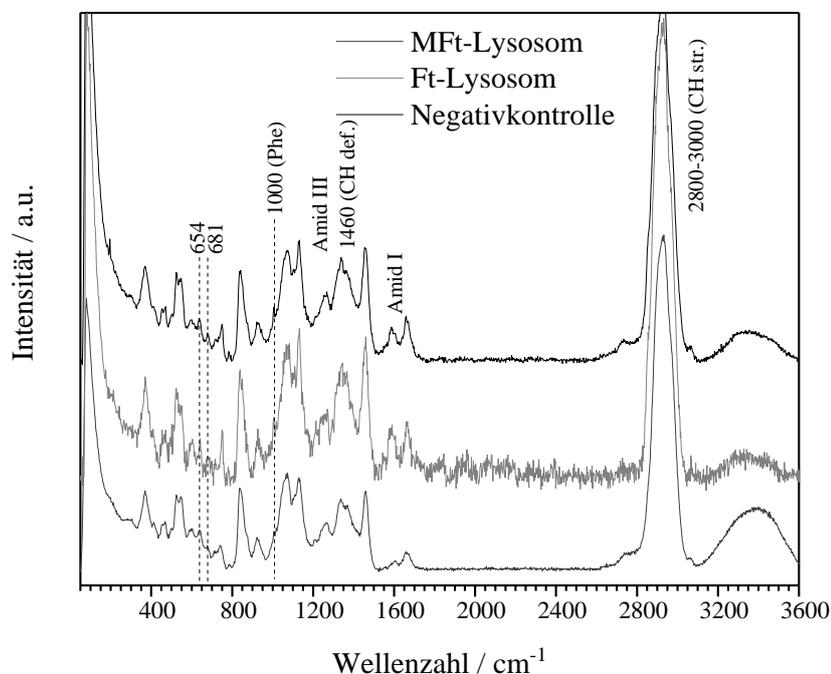


Abbildung 4.13: Raman-Spektren von mit MFt beladenem Lysosom (MFt-Lysosom), mit Ft beladenem Lysosom (Ft-Lysosom) und der Negativkontrolle. Die Raman-Spektren wurden mit einer Wellenlänge von $\lambda_0 = 785 \text{ nm}$, mit einem $100\times$ -Objektiv und mit einem optischen Abschwächer von 50 % aufgenommen. Die Integrationszeit betrug $100 \times 10 \text{ s}$.

Die Proben zeigen eine hohe Hitzestabilität und ein gutes Signal-zu-Rauschen-Verhältnis bereits bei kurzen Messzeiten und unter Anwendung längerer Laserwellenlänge (785 nm). Die für Proteine charakteristischen Banden wie z.B. die Phe-Ringatmungsbande bei 1000 cm^{-1} sind in allen Raman-Spektren zu erkennen. Ausgeprägt sind vor allem die von den C-H-Deformationsschwingungen produzierten Banden bei 1460 cm^{-1} und von den C-H-

Streckschwingungen stammenden Banden bei $2800 - 3000 \text{ cm}^{-1}$. Diese stammen höchstwahrscheinlich zum Teil von der untersuchten Lipidmembran des Lysosoms selbst. Die Amid I- und III-Banden sind sehr breit und decken die spezifischen Positionen für alle Arten der Sekundärstrukturen ab.

In keinem Raman-Spektrum konnten jedoch Banden von MFt und Ft gefunden werden. Im relevanten Bereich von 665 cm^{-1} bis 730 cm^{-1} , in dem die markante Bande zu erwarten ist, die auf das Vorhandensein von Magnetit, Maghemit und Ferrihydrit im Eisenkern hinweist, treten lediglich zwei bei 654 cm^{-1} und 681 cm^{-1} auf. Da sie in allen drei Spektren vorkommen, werden diese eher den Aminosäuren oder Bestandteilen des Lysosoms zugeordnet.

Lange Messzeiten wurden zur Erhöhung der Intensität der für die Analyse des Eisenkerns relevanten Banden angewendet, damit sie dann im Raman-Spektrum erkennbar werden. Um die Probe nicht zu beschädigen wurde zunächst mit 10 % der maximalen Laserleistung gemessen. Da sich die Probe als relativ unempfindlich erwies, konnte die Laserleistung bis auf 50 % erhöht werden. Trotz langer Messzeiten und hoher Laserleistung konnten keine Unterschiede in den Raman-Spektren von mit Ft und MFt geladenen Lysosom-Proben und der Negativkontrolle vermerkt werden. Eine kleine Bande bei 681 cm^{-1} im Raman-Spektrum von Eq-Ft und MFt könnte auf Magnetit hindeuten. Jedoch stellt dies eine sehr große Verschiebung um 16 cm^{-1} zur Position der Magnetit-Referenz dar (Magnetit 665 cm^{-1}). Außerdem ist diese Bande auch im Raman-Spektrum der Negativkontrolle zu erkennen und kann viel eher einer Aminosäure oder Lysosomkomponente zugeordnet werden.

Ein plausibler Grund für das Fehlen der Eisenoxid/-hydroxid-spezifischen markanten Bande bei 700 cm^{-1} , ist das extrem niedrige Konzentrationsverhältnis von Eisen zu Protein bzw. zur biologischen Matrix. Dies könnte dazu führen, dass diese Bande verdeckt ist. Auch der Versuch, längere Integrationszeiten ($200 \times 10 \text{ s}$) anzuwenden, um ein Erscheinen dieser Bande mit der Zeit zu erzielen, war erfolglos.

4.4.2 FAZIT ZUR RAMAN-SPEKTROSKOPISCHEN ANALYSE DES EISENKERNS IM LYSOSOMALEN FERRITIN UND MAGNETOFERRITIN

Die Raman-Analyse von in Lysosomen eingeschlossenen Ft- und MFt wird durch die erhöhte Komplexität der Raman-Spektren erheblich erschwert. Die Erhöhung der Proteinanteile in der Probe sorgt für eine Zunahme der Bandenzahl und beeinträchtigt eine

genaue Bandenzuordnung. Einige Banden liegen auch in den für die Charakterisierung der Mineralphase des Eisenkerns relevanten Bereichen (654 cm^{-1} und 681 cm^{-1}).

Ein weiterer Grund, warum keine Signale für die gesuchten Eisenverbindungen gefunden werden, könnte deren sehr niedrige Konzentration in der Probe sein. Es besteht daher die Möglichkeit, dass Magnetit- und Ferrihydrit-Banden überlagert werden und somit nicht erkannt werden können.

Außerdem enthalten Lysosomen eine Reihe von Verdauungsenzymen, die Polymere zu Monomeren abbauen [126]. Die Ferritinproteinhülle wird möglicherweise durch diese Enzyme abgebaut, was zu einer Freisetzung der Eisenoxide bzw. -hydroxide führt.

4.5 MODELLSTUDIE: REDUKTIVE TRANSFORMATION VON FERRIHYDRIT ZU MAGNETIT

Eisenoxide und -hydroxide können durch äußere Einflüsse ineinander umgewandelt werden. Nähere Erkenntnisse hierzu wären wichtig für das allgemeine Verständnis der Biomineralisation des Eisenkerns. Eine induzierte *in vivo* Umwandlung von Ferritin (Ft) zu Magnetoferritin (MFt) durch Transformation des Eisenkerns von Ferrihydrit zu Magnetit würde eine alternative MFt-Herstellung darstellen. Das Verständnis, wie die Umwandlung von Ferrihydrit (*Fh*) zu Magnetit (*Mag*) abläuft, ist dabei vonnöten. Eine im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Literaturrecherche konnte jedoch keine Studien zu dieser Transformation finden.

Die folgenden Modelle sollen helfen wichtige Faktoren für die Umwandlung von *Fh* und *Mag* zu erkennen. Da *Mag* aus Fe^{2+} - und Fe^{3+} -Ionen aufgebaut ist, während *Fh* ausschließlich aus Fe^{3+} -Ionen besteht, müsste bei deren Umwandlung von *Fh* zu *Mag* von einer Reduktion ausgegangen werden. Es werden im folgenden drei Modelle vorgestellt. Zuerst wird versucht die erwünschte Transformation durch die einfache Zugabe potenzieller Elektronendonatoren zu erreichen. Eine weitere Möglichkeit stellen sog. Elektronentransporter dar und schließlich wird getestet, ob ein Überschuss an Fe^{2+} -Ionen mit gelösten Fe^{3+} -Ionen zu *Mag* assembliert.

Die Raman-Analyse dient zur Feststellung der reduktiven Transformation von *Fh* zu *Mag*. Um laserinduzierte Transformationen bestmöglich auszuschließen, wurde stets mit gleichbleibenden Raman-Bedingungen gearbeitet ($\lambda_0 = 633\text{ nm}$; 1 mW ; $50\times\text{LWD}$ -Objektiv, $30 \times 10\text{ s}$).

4.5.1 RAMAN-ANALYSE DER REDUKTIVEN TRANSFORMATION

In der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene Modelle getestet und anschließend ihre erhaltenen Ergebnisse analysiert und diskutiert.

Modell 1: Transformation durch Zugabe potenzieller Elektronendonatoren

Für die Umwandlung von *Fh* zu *Mag* wurde Ascorbinsäure (*Asc*) zugegeben. Als weitere Substanzen wurden Acetat (*AcO*), Pyruvat (*Pyr*) und Lactat (*Lac*) ausgewählt, denn einige metallreduzierende Mikroorganismen, wie z.B. *Geobacter*, benötigen diese Substanzen als Elektronendonatoren für die Reduktion von Eisen [127-130].

Bei den Experimenten wurden zu *Fh* jeweils eine gleiche Menge (100 μ l der 1 M-Lösung) der oben genannten Substanzen zugegeben und für 24 h gerührt.

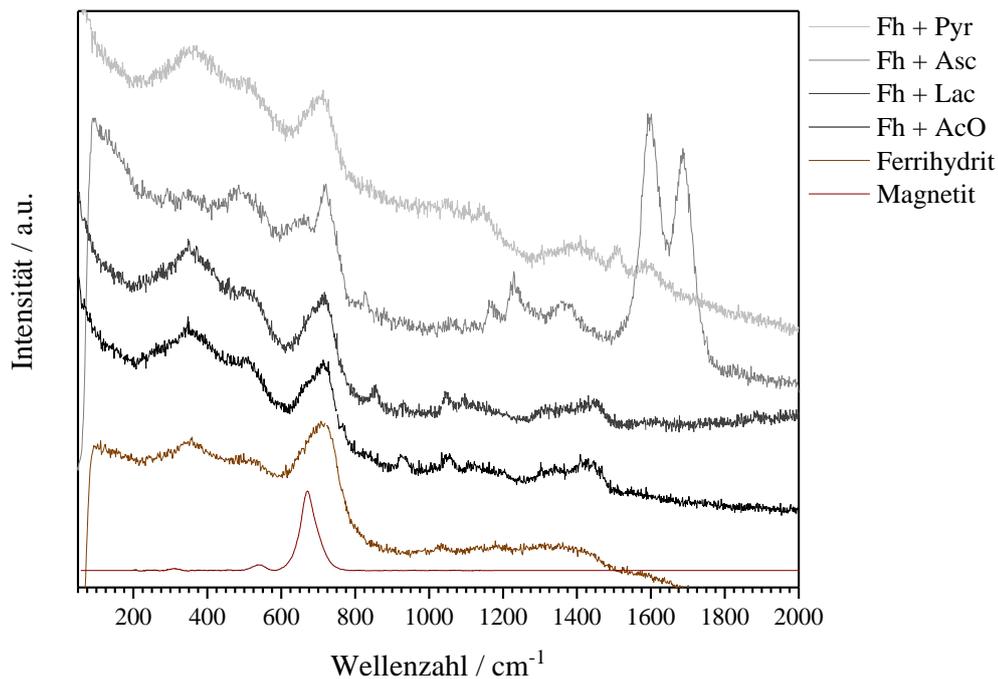


Abbildung 4.14: Raman-Spektren von *Fh* nach Zugabe von *Pyr*, *Asc*, *Lac* und *AcO* (von oben nach unten).

In Abbildung 4.14 konnte eine signifikante Änderung des Raman-Spektrums von mit *Asc* versetztem *Fh* beobachtet werden. Betrachtet man das Raman-Spektrum von *Fh* mit *Asc*, so fällt eine Spaltung der breiten Bande bei 700 cm^{-1} in zwei Banden mit ihren Maxima bei 665 cm^{-1} und 720 cm^{-1} auf. Die Bande bei 665 cm^{-1} ist ein Hinweis auf *Mag*. Die Bande bei

720 cm^{-1} wurde durch die Zugabe von *Asc* auffallend schmaler. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass das Kristallgitter von *Fh* nach Zugabe von *Asc* höher geordnet ist. *Asc* scheint einen starken Einfluss auf *Fh* auszuüben.

Bereits bei der Probenvorbereitung konnte innerhalb weniger Minuten nach Zugabe von *Asc* ein Farbumschlag von braun zu schwarz beobachtet werden, was nicht der Fall bei Zugabe der übrigen Reduktionsmittel war. Die festgestellten Änderungen im Raman-Spektrum von *Fh* mit *Asc* bestätigen die bekannte Affinität von *Asc* zur Reduktion von Eisen [131]. Zudem fungiert *Asc* als Sauerstoff-Fänger (engl. *oxygen scavenger*) [132], was die Bildung von *Mag*, auch unter nicht vollständigem Sauerstoffausschluss, begünstigt.

Da *Asc* einen starken Einfluss auf *Fh* ausübt, wurde dieses Reduktionsmittel verwendet, um die Konzentration, ab der die Zugabe von *Asc* die Wirkung zeigt, festzustellen (Abbildung 4.15). Eine Änderung des Raman-Spektrums wurde erst bei einer *Asc*-Zugabe einer molaren Konzentration von 5 mM beobachtet. Die Änderungen in den Raman-Signaturen verstärken sich mit zunehmender *Asc*-Konzentration.

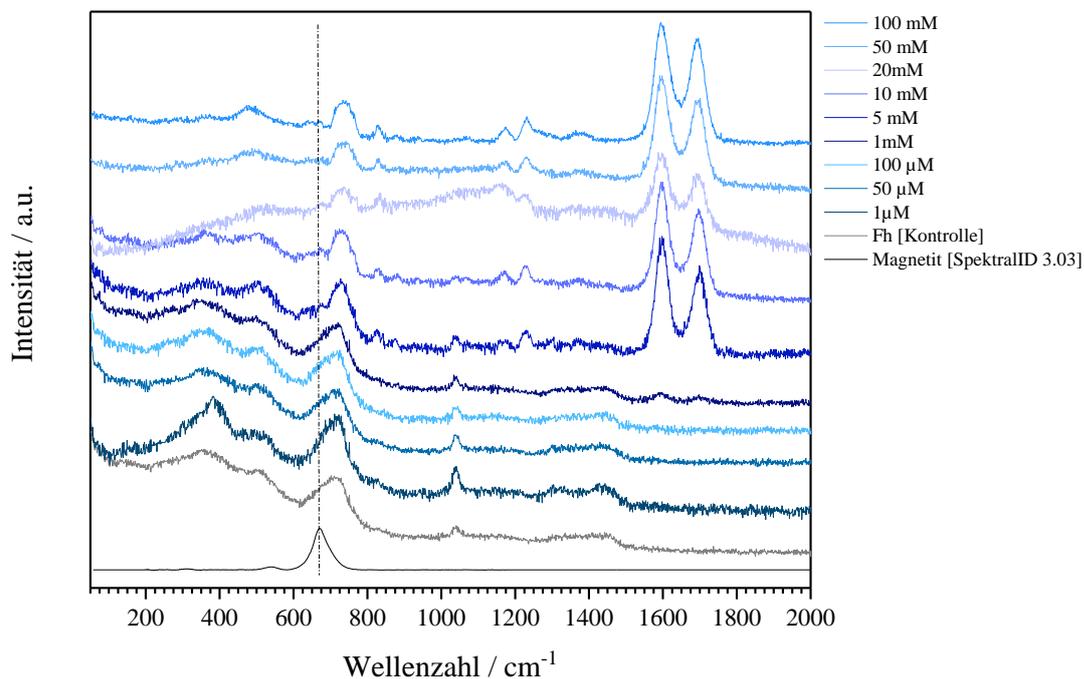


Abbildung 4.15: Raman-Spektren von *Fh* nach Zugabe verschiedener Konzentrationen von *Asc*. Von Oben nach unten nimmt die Konzentration ab: 100 mM, 50 mM, 20 mM, 10 mM, 5 mM, 1 mM, 100 μM , 50 μM , 1 μM . Ab einer Konzentration von 5 mM konnte man eine klare Änderung des Raman-Spektrums von *Fh* erkennen.

Neben *Asc* zeigt auch *AcO* eine Wirkung auf *Fh*. Im Raman-Spektrum von *Fh* mit *AcO* ist eine Schulter bei 665 cm^{-1} zu erkennen. Die Zugabe von *Pyr* und *Lac* rufen dagegen keine sichtbaren Änderungen im Raman-Spektrum hervor.

Da *Mag* bevorzugt unter sauerstoffarmen bzw. -freien Bedingungen gebildet wird, wird die Wirkung des Reduktionsmittels auch in Abwesenheit von Sauerstoff untersucht. Der Prozess wurde mit *Asc* und *AcO* unter Sauerstoffausschluss wiederholt. *AcO* und *Asc* (jeweils 1 mM) wurden mit *Fh* für 24 h unter Sauerstoffausschluss gerührt. Die resultierenden Raman-Spektren sind in Abbildung 4.16 gezeigt und wurden an verschiedenen Positionen der gleichen Probe aufgenommen. In der Abbildung werden mehrere Spektren derselben Probe gezeigt und die einzelnen Spektren derselben Probe mit Nummern markiert.

Die in Abbildung 4.16 gezeigten Raman-Spektren von mit *Asc* versetzten Ferrihydrit zeigen eine breite Bande mit zwei Maxima, deren erste Position bei 665 cm^{-1} liegt. Diese kann auch von *Mag* stammen. *AcO* hingegen zeigt keine signifikanten Änderungen im Raman-Spektrum, jedoch gibt die Schulter bei 665 cm^{-1} einen Hinweis auf die mögliche Anwesenheit von *Mag*. Dennoch ist diese Schulter ausgeprägter als bei den Experimenten unter ambienten Bedingungen (Abbildung 4.14). Dies bestätigt die Aussage, dass *Mag* bevorzugt unter sauerstoffarmen bzw. -freien Bedingungen gebildet wird.

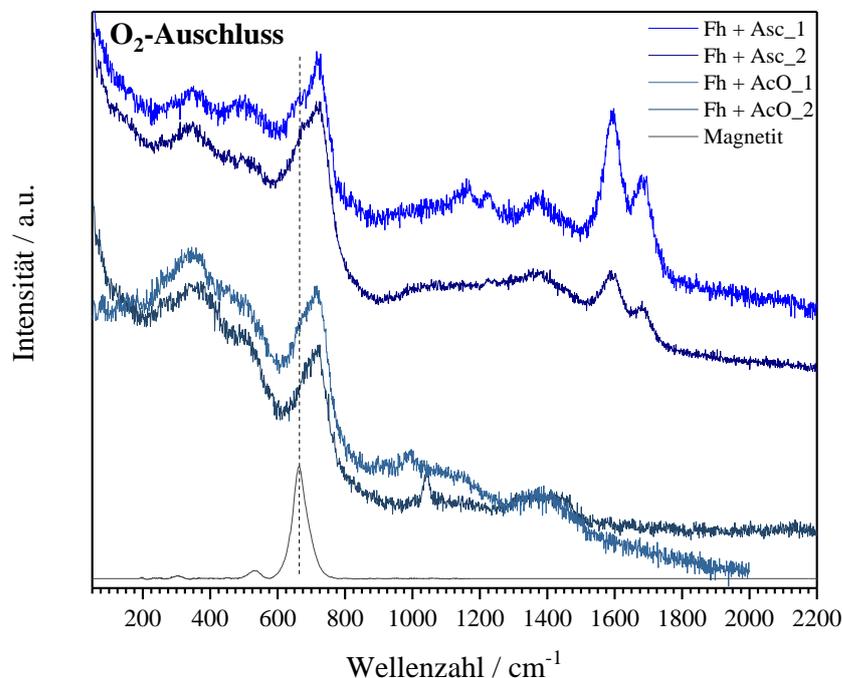


Abbildung 4.16: Raman-Spektren von *Fh* nach Zugabe von *Asc* und *AcO* unter Sauerstoffausschluss sowie das Raman-Referenzspektrum von *Mag*.

Für die folgenden Experimente der weiteren Modelle mit zusätzlicher Zugabe von Fe^{2+} -Ionen und Elektronen-Transporter wird ausschließlich mit *AcO* gearbeitet. Denn *Asc* reagierte für die Tests zu stark und beeinträchtigt daher die Aussage, ob *Asc* alleine die Umwandlung induzierte, oder ob die weiteren Faktoren wie zusätzliche Fe^{2+} -Ionen und Elektronen-Transporter ebenfalls eine Rolle spielten.

Modell 2: Elektronen-Transporter

Elektronen-Transporter sind Komponenten, die in der Lage sind, Elektronen zu transportieren. Nevin et al. schlug einige Komponenten vor, die als Elektronen-Transporter zwischen Fe^{3+} -reduzierenden Mikroorganismen und Fe^{3+} -Oxy-Verbindungen fungieren (Abbildung 4.17). Zu diesen gehört auch Cystein (*Cys*), das für die folgenden Experimente verwendet wurde.

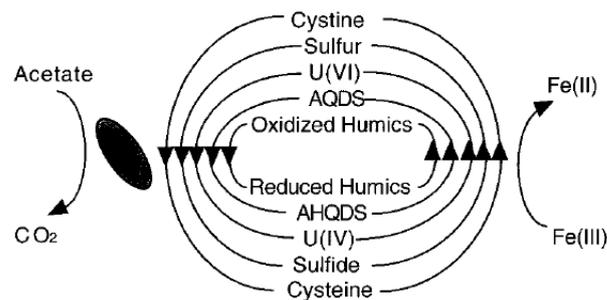
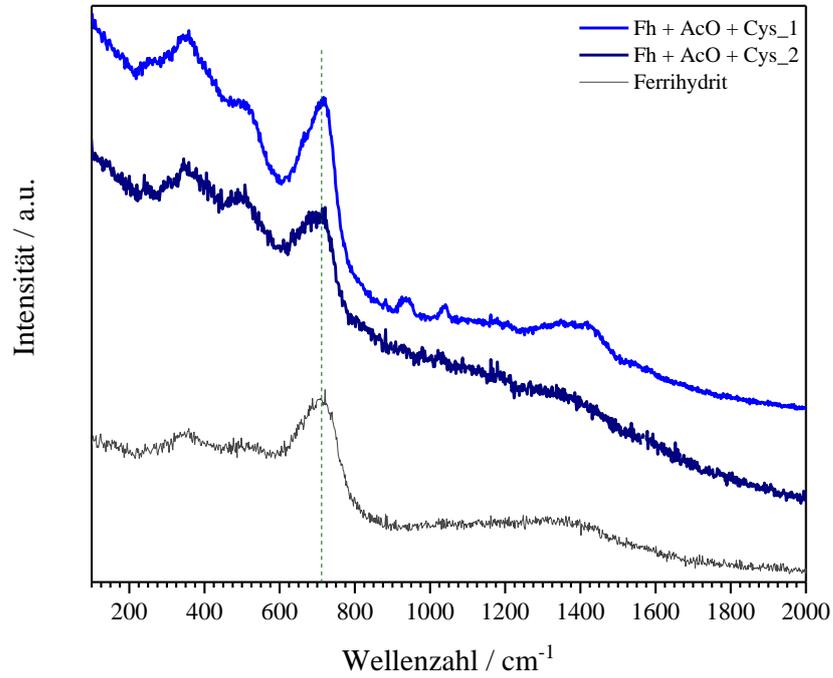


Abbildung 4.17: Modell für verschiedene Komponenten, die nach Nevin et al. als Elektron-Transporter zwischen Fe^{3+} -reduzierenden Mikroorganismen und Fe^{3+} -Oxy-Verbindungen fungieren können. Aus Nevin et al., 2000 [133].

In Abbildung 4.18 werden die Raman-Spektren von *Fh* nach Zugabe von *AcO* und *Cys*, einmal in Anwesenheit von Sauerstoff und einmal unter Sauerstoffausschluss, gezeigt. Die Inkubationszeiten betragen jeweils 5 h und eine Woche. Die Spektren wurden an verschiedenen Stellen der Probe aufgenommen, denn die Proben zeigten nach längerer Inkubationszeit eine inhomogene Verteilung der Minerale. In den Abbildungen werden daher mehrere Spektren derselben Probe gezeigt und die einzelnen Spektren derselben Probe mit Nummern markiert. Nach 5 h konnten sowohl in Anwesenheit von Sauerstoff als auch unter Sauerstoffausschluss keine wesentlichen Änderungen der Raman-Spektren beobachtet werden. Auch das äußere Erscheinung zeigte keine Änderungen (Abbildung 4.18 a und b).

In Anwesenheit von O₂

nach 5 h



nach einer Woche

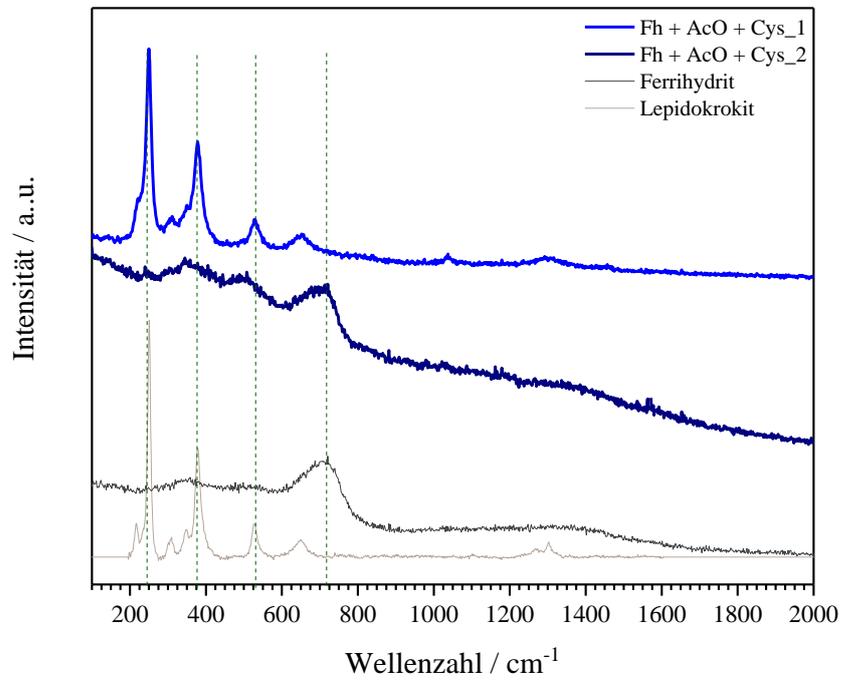
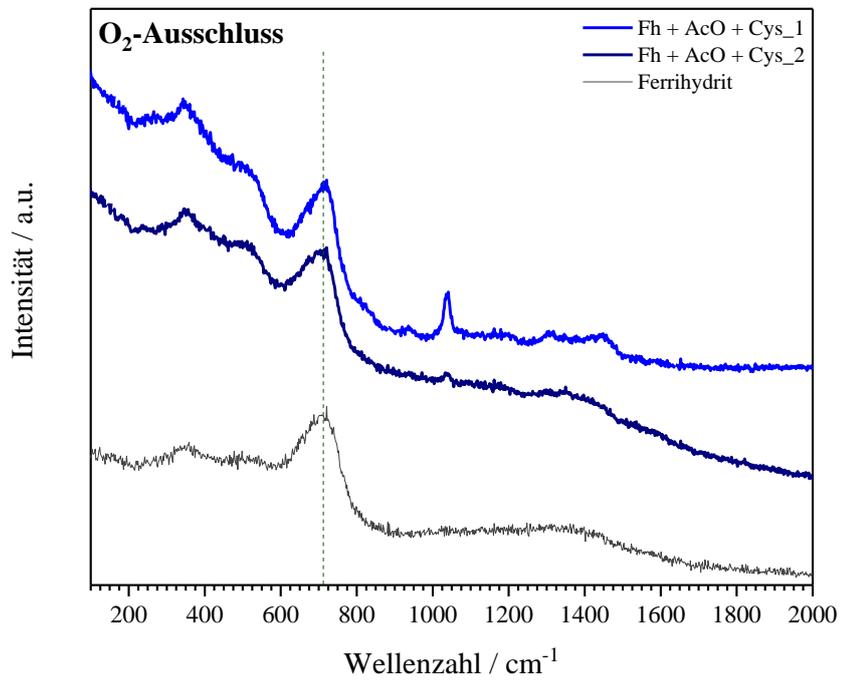


Abbildung 4.18 a: Raman-Spektren von Fh nach Zugabe von AcO und Cys in Anwesenheit von Sauerstoff.

In Abwesenheit von O₂

nach 5 h



nach einer Woche

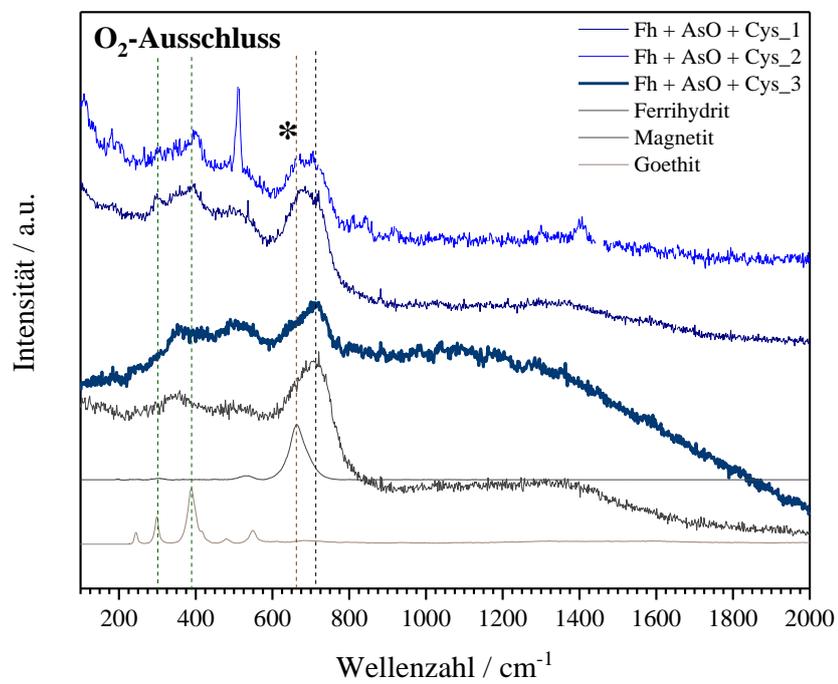


Abbildung 4.18 b: Raman-Spektren von Fh nach Zugabe von AcO und Cys unter Sauerstoffausschluss.

Nach einer Woche jedoch wurde unter beiden Bedingungen an einigen Stellen der Mineralprobe eine Farbänderung zu gelb beobachtet. Die gelblichen Stellen der Proben, die unter Anwesenheit von Sauerstoff gelagert wurden, offenbarten das Vorhandensein von Lepidokrokit (*Lep*). *Lep* erzeugt Raman-Banden bei 250, 378 und 527 cm^{-1} (*SpectralID 3.03, Thermo Scientific, USA*). Die dunklen Stellen zeigten anhand der Raman-Spektren nach wie vor *Fh* an (Abbildung 4.18 a).

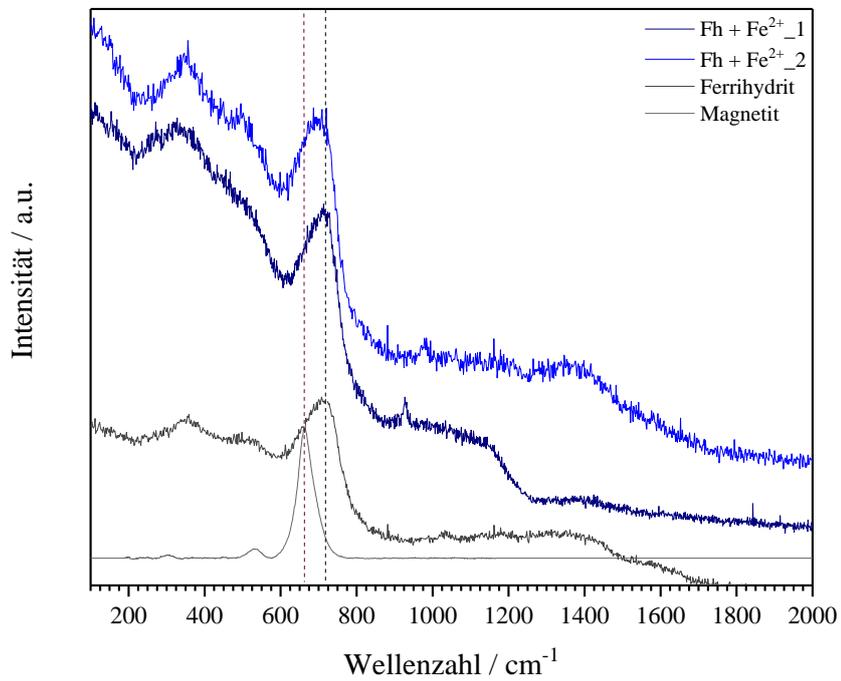
Unter Sauerstoffausschluss bildete sich an den gelblichen Stellen nach einer Woche bevorzugt das strukturell verwandte Goethit (*Goe*), das Banden bei 244, 299, 388, 478 und 548 cm^{-1} zeigt (*SpectralID 3.03, Thermo Scientific, USA*). An den dunklen Stellen erschienen regelmäßig im Raman-Spektrum von *Fh* Banden bei 730 cm^{-1} , 510 cm^{-1} und 350 cm^{-1} und eine zusätzliche Bande, deren Maximum bei 665 cm^{-1} lokalisiert ist (Abbildung 4.18 b, markiert mit einem Asterisk). Dies kann auf die Anwesenheit von *Mag* hindeuten. Da *Mag* wie bereits erwähnt bevorzugt unter Sauerstoffausschluss gebildet wird, ist die Zuordnung dieser Bande zu *Mag* plausibel. Anhand der Ergebnisse der Raman-Analyse kann zusammengefasst schlussgefolgert werden, dass die Reduktion mit Hilfe der Elektronen-Transporter deutlich schneller abläuft, als es durch die einfache Zugabe von Reduktionsmitteln möglich ist.

Modell 3: Zusätzliche Fe^{2+} -Zugabe

Mag besteht aus Fe^{2+} -Ionen und Fe^{3+} -Ionen im Verhältnis 1:2. Es wird zunächst geprüft, ob die Zugabe von Fe^{2+} -Ionen zur Reaktion mit gelösten Fe^{3+} -Ionen führt, was sich als Niederschlag von *Mag* äußern sollte. Als Fe^{2+} -Ionen Quelle wurde Ammoniumeisen(II)-sulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$) hergenommen. Die Zugabe erfolgte kontinuierlich über einen Zeitraum von einer Woche, wobei jeden zweiten Tag jeweils 50 μl der 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ -Lösung den untersuchten Substanzen zugefügt wurde. Die kontinuierliche Zugabe der Fe^{2+} -Ionen wird mit drei Arten von Proben durchgeführt. Die erste Probe ist *Fh* alleine. Bei den zwei weiteren Proben wird analog wie in Modell 1 und 2 verfahren, jedoch mit zusätzlicher kontinuierlicher Addition von $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$. Alle Experimente, die in Anwesenheit von O_2 durchgeführt wurden, werden in Abbildung 4.19 gezeigt. Die Experimente, die unter Sauerstoffausschluss durchgeführt wurden, werden in Abbildung 4.20 präsentiert.

In Anwesenheit von Sauerstoff: Zugabe von Fe^{2+} -Ionen

nach 5 h



nach einer Woche

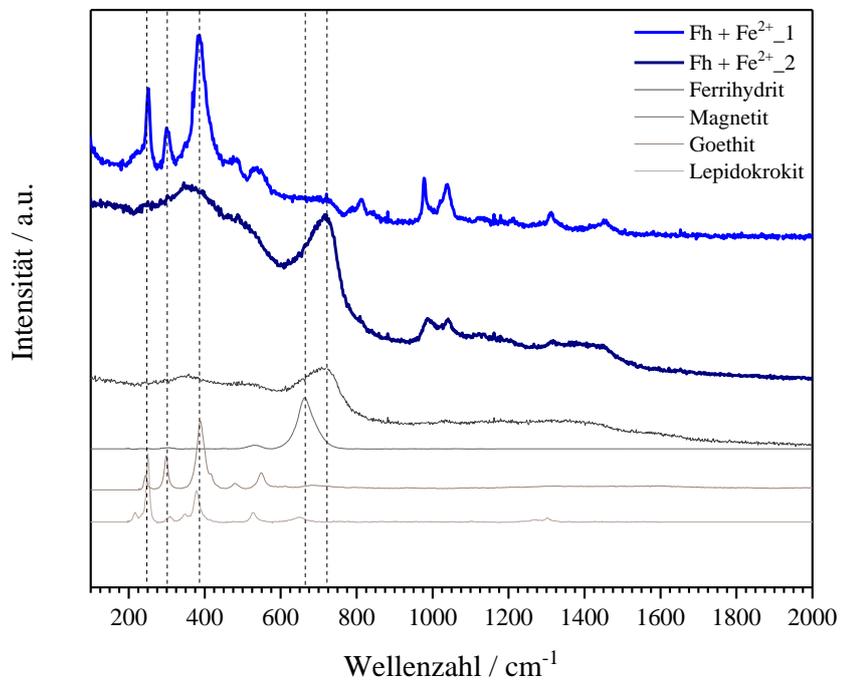
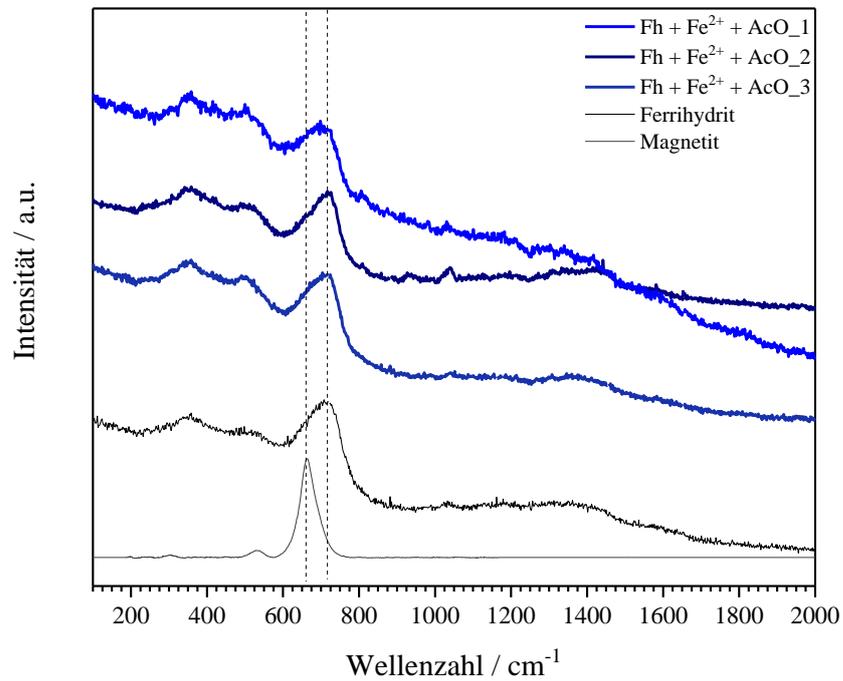


Abbildung 4.19 a: Raman-Spektren von Fh nach Zugabe von Fe^{2+} -Ionen in Anwesenheit von O_2 .

In Anwesenheit von Sauerstoff: Modell 1 mit Zugabe von Fe^{2+} -Ionen

nach 5 h



nach einer Woche

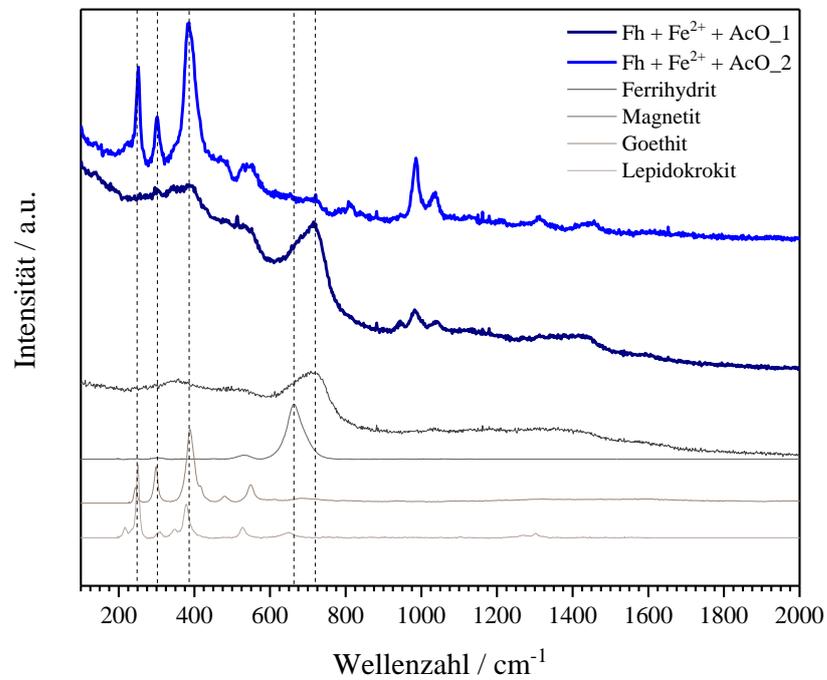
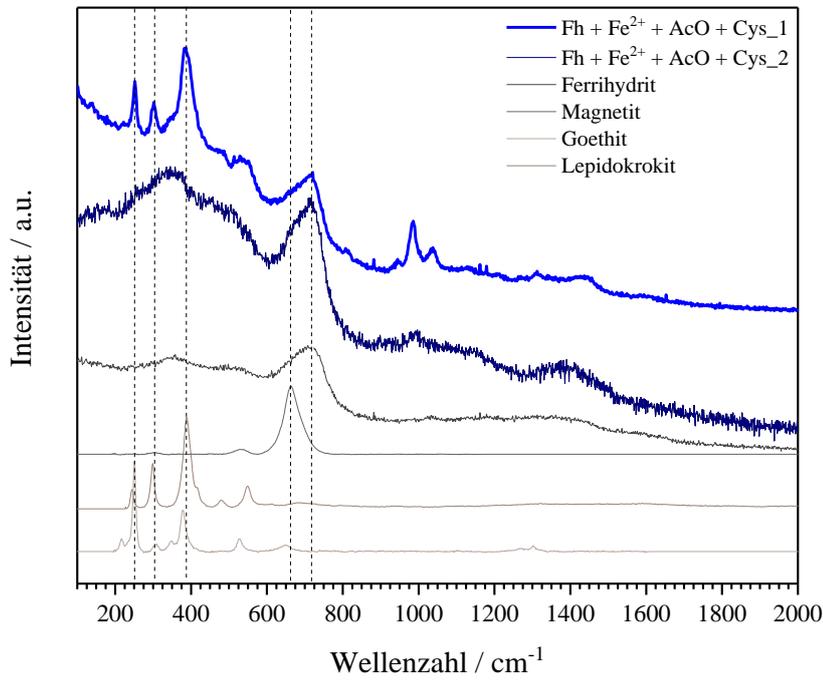


Abbildung 4.19 b: Raman-Spektren von Fh nach Wiederholung von Modell 1 mit zusätzlicher Zugabe von Fe^{2+} -Ionen in Anwesenheit von O_2 .

In Anwesenheit von Sauerstoff: Modell 2 mit Zugabe von Fe^{2+} -Ionen

nach 5 h



nach einer Woche

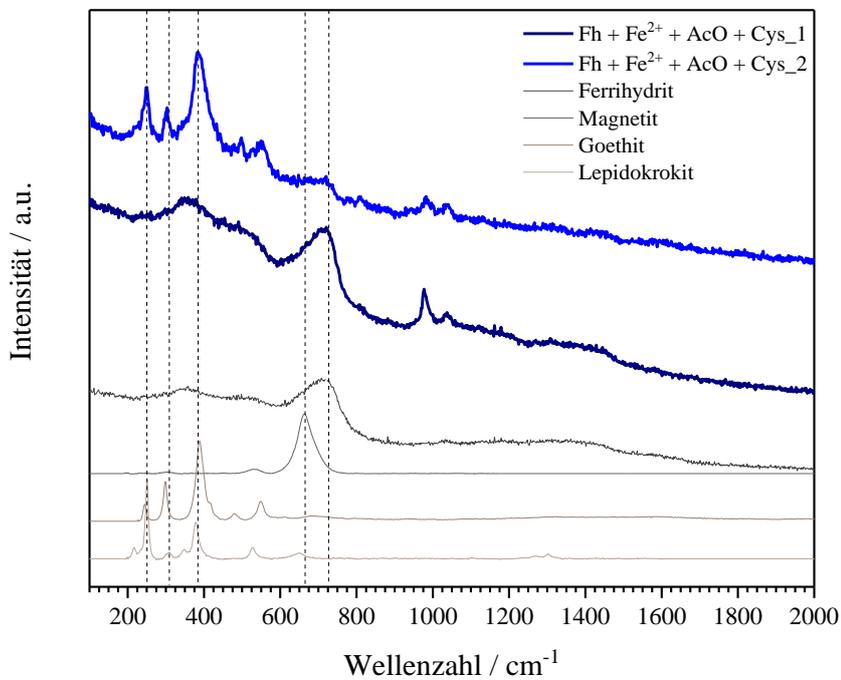
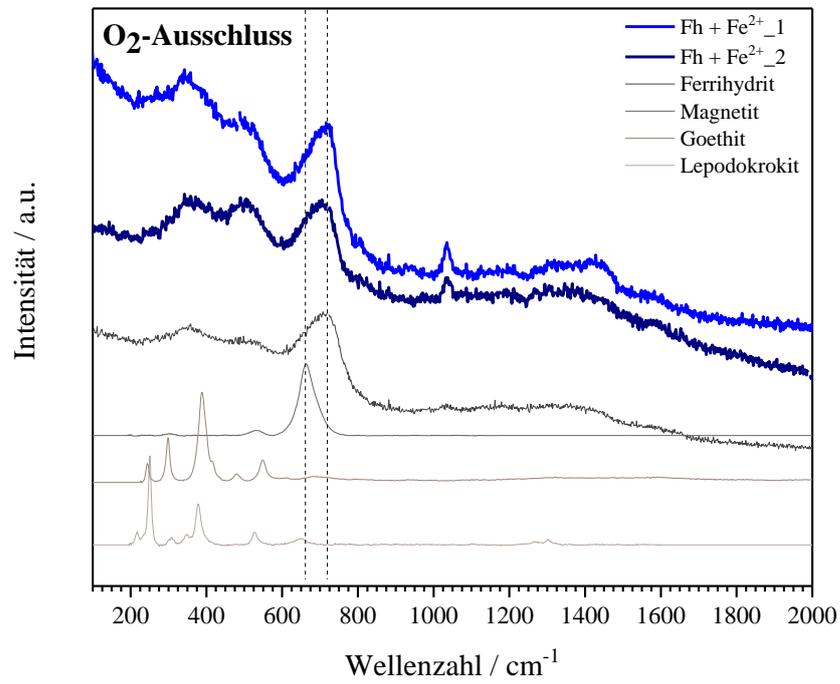


Abbildung 4.19 c: Raman-Spektren von Fh nach Wiederholung von Modell 2 mit zusätzlicher Zugabe von Fe^{2+} -Ionen in Anwesenheit von O_2 .

In Abwesenheit von Sauerstoff: Zugabe von Fe^{2+} -Ionen zu

nach 5 h



nach einer Woche

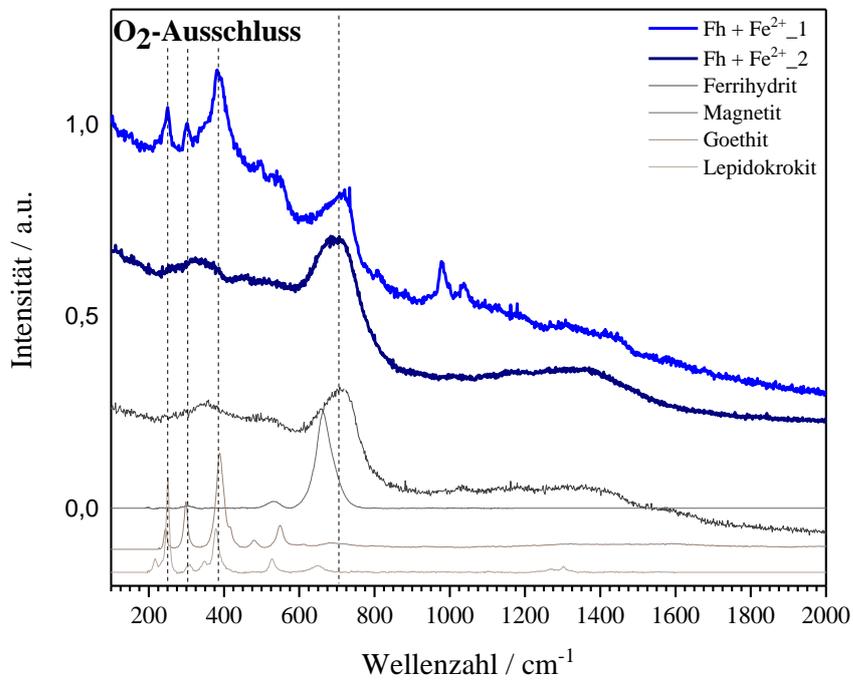
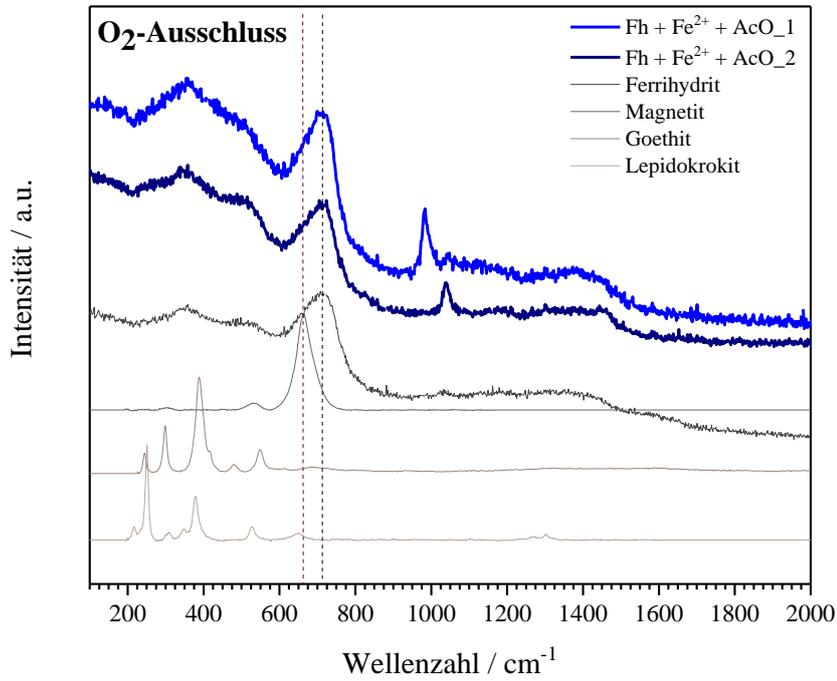


Abbildung 4.20 a: Raman-Spektren von Fh nach Zugabe von Fe^{2+} -Ionen unter Sauerstoffausschluss.

In Abwesenheit von Sauerstoff: Modell 1 mit Zugabe von Fe^{2+} -Ionen

nach 5 h



nach einer Woche

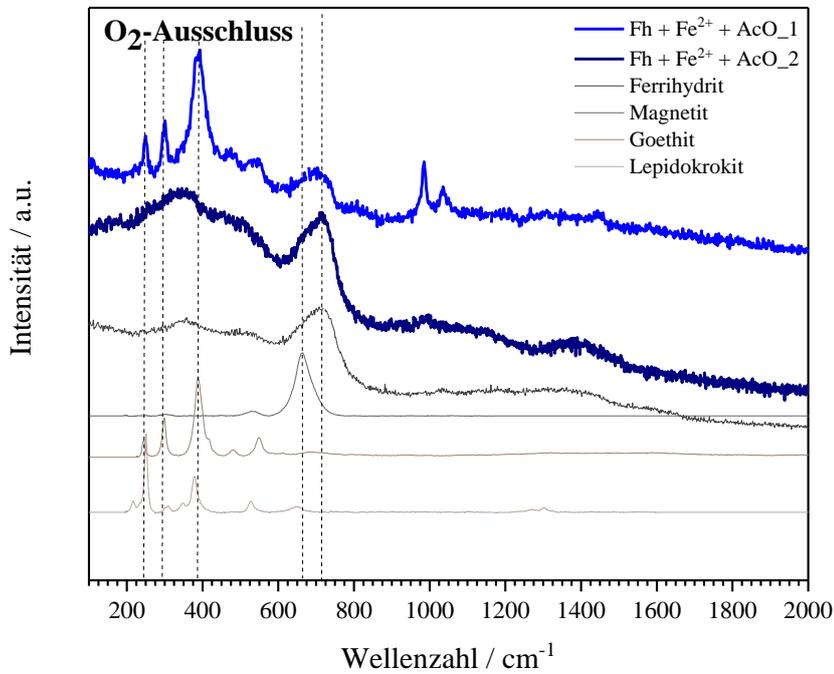
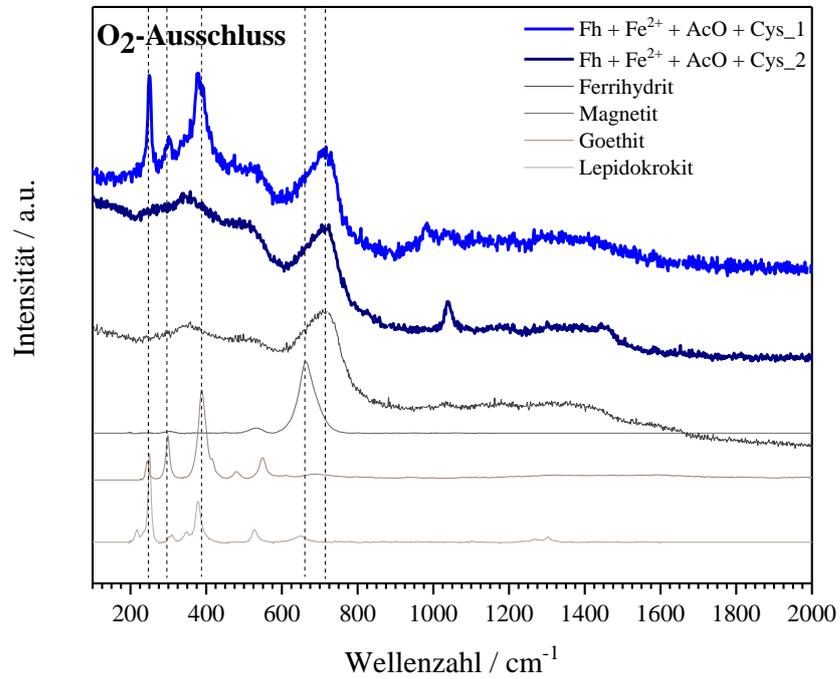


Abbildung 4.20 b: Raman-Spektren von Fh nach Wiederholung von Modell 1 mit zusätzlicher Zugabe von Fe^{2+} -Ionen unter Sauerstoffausschluss.

In Abwesenheit von Sauerstoff: Modell 2 mit Zugabe von Fe^{2+} -Ionen

nach 5 h



nach einer Woche

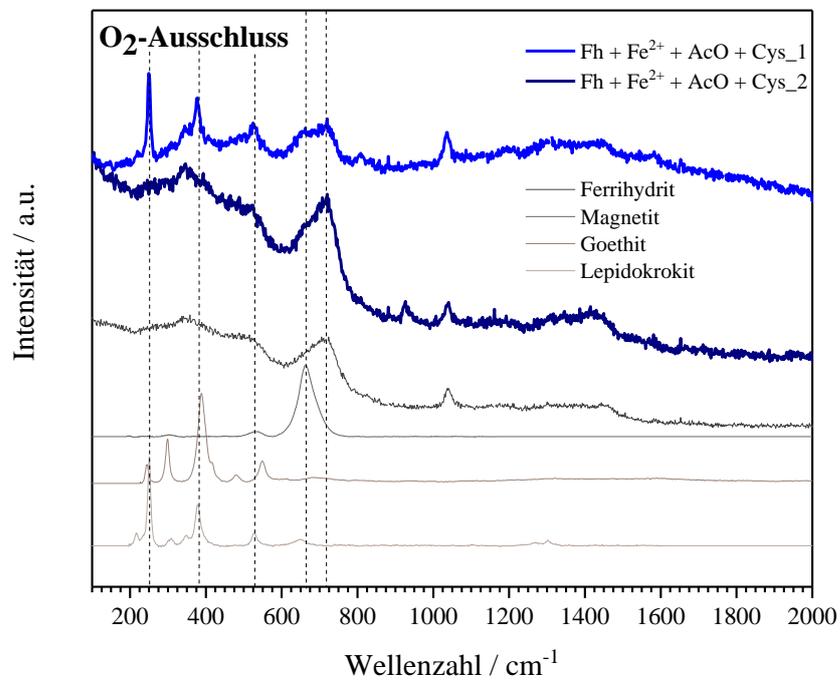


Abbildung 4.20 c: Raman-Spektren von Fh nach Wiederholung von Modell 2 mit zusätzlicher Zugabe von Fe^{2+} -Ionen unter Sauerstoffausschluss.

In Abbildung 4.19 a sind die Raman-Spektren nach Zugabe von Fe^{2+} -Ionen gezeigt. Die Raman-Spektren wurden nach 5 h und einer Woche aufgenommen. 5 h nach Zugabe von Fe^{2+} -Ionen konnten keine relevanten Änderungen in den Raman-Spektren beobachtet werden. Nach einer Woche änderte sich in manchen Bereichen der Probe die Farbe von rotbraun nach gelb. Das Vorhandensein von *Goe* konnte durch das klare Auftreten der Banden bei 299 cm^{-1} und 388 cm^{-1} nachgewiesen werden. Eine Bande bei 250 cm^{-1} kann *Lep* zugeordnet werden. Die dunkleren Bereiche zeigen die typischen Signale von *Fh* bei 720 cm^{-1} . Das gleiche Phänomen konnte wahrgenommen werden, wenn neben Fe^{2+} -Ionen zusätzlich *AcO* in der Reaktionsmischung vorhanden war. Während nach 5 h keine wesentlichen Änderungen in den Raman-Spektren zu sehen waren, zeigte die Raman-Analyse nach einer Woche bei den gelblichen Stellen *Goe/Lep* und bei den dunkleren *Fh* an (Abbildung 4.19 b). Eine Besonderheit konnte nach Zugabe von *AcO* und *Cys* neben Fe^{2+} beobachtet werden (Abbildung 4.19 c). Bereits nach 5 h sind Banden von *Goe* und *Lep* sichtbar, die an den gelblichen Stellen gefunden wurden, die auch nach einer Woche zu erkennen sind. Die dunklen Stellen liefern Raman-Spektren, die dem *Fh* entsprechen. Nach einer Woche ist im Raman-Spektrum von *Fh* eine sehr schwache Schulter bei 665 cm^{-1} zu verzeichnen, was ein Hinweis auf *Mag* ist.

Dieselben Experimente wurden unter Sauerstoffausschluss wiederholt. In Abbildung 4.20 unten befinden sich die jeweiligen Raman-Spektren, die nach 5 h und einer Woche aufgenommen wurden. Bei Zugabe von Fe^{2+} -Ionen konnten jeweils nach 5 h keine Änderungen der Raman-Spektren beobachtet werden. In den Spektren, die nach einer Woche aufgenommen wurden, sind Banden zu erkennen, die von *Goe* und *Lep* stammen. (Abbildung 4.20 a). Die Raman-Spektren der Proben, die mit Fe^{2+} -Ionen mit *AcO* angesetzt wurden, zeigten ebenfalls nach 5 h keine Änderungen der Raman-Spektren. Nach einer Woche sind Banden von *Goe* und *Lep* ersichtlich (Abbildung 4.20 b). Durch Zugabe von *AcO* und *Cys* neben Fe^{2+} konnte ein ähnlicher Prozess wie bei den Tests in Anwesenheit von Sauerstoff vermerkt werden. Bereits nach 5 h sind in den Raman-Spektren Banden von *Goe* und *Lep* erkenntlich. Die Banden von *Lep* sind intensiver als die von *Goe*, was auf einen höheren *Lep*-Anteil bei ähnlichem Raman-Querschnitt hindeutet. Auch nach einer Woche sind beide Minerale noch im selben Intensitätsverhältnis vorhanden. Zudem ist nach einer Woche im Raman-Spektrum von *Fh* eine Schulter bei 665 cm^{-1} vorhanden (Abbildung 4.20 c), die einen zuverlässigen Hinweis auf die Anwesenheit von *Mag* gibt. In einem weiteren Raman-Spektrum ist eine breite Bande mit Maxima bei 665 cm^{-1} und 720 cm^{-1} sehr

eindeutig zu verzeichnen. Hierbei handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um Maghemit (*Magh*). Einen weiteren zuverlässigen Hinweis auf *Magh* geben im selben Raman-Spektrum die Eisenoxid-typischen mittelstarken Banden mit gleicher Intensität bei 500 cm^{-1} und 380 cm^{-1} . Die Entstehung von *Magh* kann über zwei Wege erfolgen. Entweder kann *Magh* ein Dehydrationsprodukt von *Lep* sein [33] oder es ist während der Messung als Oxidationsprodukt von *Mag* entstanden.

In Tabelle 4.3 werden die gebildeten Minerale nach Zugabe der jeweiligen Substanz (Fe^{2+} -Ionen, *AcO*, *Cys*) zusammengefasst aufgelistet.

Vergleicht man die Raman-Daten, ist die signifikante Änderung in den Raman-Spektren nach Zugabe von Fe^{2+} -Ionen, *AcO* und *Cys* auffallend. Insbesondere unter Sauerstoffausschluss war die Bildung von *Magh* und *Mag* möglich. Die Kombination der drei zugegebenen Substanzen scheint die Umwandlung von *Fh* zu *Goe*, *Lep*, *Mag* und *Magh* zu beschleunigen.

Tabelle 4.3: Zusammenfassende Darstellung der gebildeten Minerale, jeweils nach Zugabe von Fe^{2+} -Ionen, Fe^{2+} -Ionen und *AcO* und Fe^{2+} -Ionen, *AcO* und *Cys*. Die Experimente fanden einmal in Anwesenheit von Sauerstoff und einmal unter Sauerstoffausschluss statt. Prominente Banden sind fett markiert.

mit O ₂	Fh	+Fe ²⁺	+Fe ²⁺ + AcO	+Fe ²⁺ + AcO + Cys
5 h		Fh	Fh	Fh, Goe/Lep ,
1 Woche		Fh, Goe/Lep ,	Fh, Goe/ Lep ,	Fh, Goe/Lep , <i>Mag</i> (?)
ohne O ₂	Fh	+Fe ²⁺	+Fe ²⁺ + AcO	+Fe ²⁺ + AcO + Cys
5 h		Fh	Fh	Fh, Lep/Goe
1 Woche		Fh, Goe/Lep ,	Fh, Goe/Lep ,	Fh, Lep/Goe , Magh, Mag

4.5.2 ZUSAMMENFASSENDER BEMERKUNG ZU DEN DREI MODELLEN

Die Zugabe ausgewählter Substanzen wie Ascorbinsäure (*Asc*), Acetat (*AcO*), und Cystein (*Cys*) und Fe^{2+} -Ionen löst eine Umwandlung von Ferrihydrit (*Fh*) in andere Eisenverbindungen vorzugsweise in Goethit (*Goe*) und Lepidokrokit (*Lep*) aus.

Eine signifikante Änderung des Raman-Spektrums bewirkte die Zugabe von *Asc*. Dies liegt vor allem darin begründet, dass *Asc* zum einen die Funktion besitzt Eisen zu reduzieren, und zum anderen fängt *Asc* als Sauerstofffänger Sauerstoff ab, was die Bildung von Magnetit

(*Mag*) begünstigt. Die Verwendung von *Asc* scheint ebenfalls eine Wirkung auf das Ferritin zu haben. Beim am IBMI durchgeführten Versuch, *Asc* zu einer Ferritinlösung hinzu zu fügen, fiel nach Inkubation ein schwarzer Niederschlag aus. Dabei stellten die Projektpartner am IBMI mittels Native-PAGE-Gel-Analyse fest, dass nach Zugabe von *Asc* die Proteinschale intakt blieb, während das Eisen aus dem Kern verschwand. Es scheint, dass das *Asc* in den Kern gelangte und fähig war Fe^{3+} zu Fe^{2+} zu reduzieren. Das reduzierte Fe^{2+} tritt aus dem Protein heraus. Um das Fe^{2+} im Kern beizubehalten, müssten Strategien gefunden werden, die den Fe^{2+} -Austritt verhindern (Abbildung A8 im Anhang).

Die kombinierte Zugabe von *AcO*, Fe^{2+} -Ionen und Elektronen-Transporter *Cys* scheint die Transformation von *Fh* wesentlich zu beeinflussen. Offensichtlich induzieren Fe^{2+} -Ionen und *AcO* jeweils einzeln oder als Mischung (Fe^{2+} -Ionen/*AcO*) mit der Zeit eine Umwandlung von *Fh* zu *Goe* und *Lep*, sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von Sauerstoff. Diese Umwandlung ist in Kombination mit *Cys* beschleunigt, da *Cys* die Fähigkeit besitzt Fe^{3+} zu reduzieren. Hierbei sind Veränderungen der Raman-Spektren von *Fh* bereits nach wenigen Stunden zu verzeichnen. Nach einer Woche bewirkt die Kombination Fe^{2+} -Ionen/*AcO*/*Cys* sogar die Entstehung von Magnetit- und Maghemit-Banden, besonders unter Sauerstoffausschluss. Außerdem bildet sich nach Zugabe von Fe^{2+} -Ionen/*AcO*/*Cys* unter Sauerstoffausschluss bevorzugt *Lep* im Vergleich zu *Goe*. Bei den Experimenten mit Zugabe von *AcO* und/oder *Cys* ohne Beteiligung von Fe^{2+} , bildet sich in Anwesenheit von Luft bevorzugt *Lep*. Unter Sauerstoffausschluss wurden neben *Geo*/*Lep*-Banden auch eine Schulter bei 665 cm^{-1} in der markanten *Fh*-Bande beobachtet, was einen Hinweis auf das Vorhandensein von *Mag* geben könnte.

Trotzdem muss man den Interpretationen bei den Experimenten kritisch gegenüberstehen. Eine direkte Umwandlung von *Fh* zu Maghemit (*Magh*) ist bekannt, allerdings bei sehr hoher Temperatur ($> 150\text{ }^{\circ}\text{C}$), unter Luftausschluss und bei Verwendung starker Reduktionsmittel sowie Liganden, die die Umwandlung von *Fh* zu *Goe* oder *Lep* verhindern [134, 135]. In den gezeigten Experimenten konnte mit Zuhilfenahme von Elektronen-Transportern und Fe^{2+} -Ionen die Umwandlung bei Raumtemperatur durchgeführt werden, wenn auch nicht vollständig.

Vielmehr liegt die Ursache darin, dass sich *Fh* als schwach kristallines Mineral leicht unter wässrigen Bedingungen zum thermodynamisch stabileren Hämatit (*Häm*) oder *Goe*/*Lep* umwandelt [136, 137]. Die Umwandlung erfolgt generell über zwei Wege: entweder durch Lösung/Fällung zur Bildung von *Goe* oder durch Aggregation zur Bildung von Hämatit. In sauren und alkalischen Medien löst sich *Fh* auf und formt sich zu *Goe* um, die Bildung von

Häm findet eher bei neutralem pH statt [26, 138]. Die Arbeiten erfolgten im für Ferritin physiologischen pH von 7,4, wodurch eher *Häm* zu erwarten wäre.

Im Abschnitt 4.5.1 wurde erwähnt, dass Mikroorganismen *AcO*, *Pyr* und *Lac* als Elektronendonatoren für die Reduktion von Fe^{3+} benötigen. Allerdings erfüllen diese Substanzen bei den durchgeführten Experimenten die Funktion als Elektronendonator nicht. Durch die hohe adsorptive Kapazität von *Fh* fungieren diese Substanzen als Liganden [136]. Generell können lösliche Ionen und Liganden, wie auch *Asc*, *AcO*, *Pyr*, *Lac* und Sulfate, die Transformationen verlangsamen, denn adsorbierte Ionen stabilisieren *Fh* und verzögern die Freisetzung von Eisenionen in die Lösung und hindern somit die Keimbildung und das Wachstum von Kristalliten [139]. Bei einem pH-Wert von 7 – 8 ist der Einfluss der Van-der-Waals-Kräfte auf die Aggregation am höchsten [139]. Mit steigendem pH-Wert steigt die Komplexbildung mit Anionen auf der Oberfläche und durch elektrostatische Abstoßung sinkt die Tendenz zur Aggregation [139]. Dieser zuletzt genannte Prozess kommt mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht in den Experimenten vor, da mit einem pH von 7,4 gearbeitet wurde. Unter dieser Bedingung ist die Tendenz zur Agglomeration am höchsten und es waren bereits mit bloßen Auge Klumpen sichtbar. Schwertmann et al., 1970, beobachtete den Einfluss einfacher Anionen, wie z.B. Citrate, Oxalate und *AcO*, auf die Agglomeration von *Fh* und schlussfolgerte, dass mehrbasige Hydroxysäuren, wie z.B. Citrate, einen hohen adsorptiven Effekt auf der Mineraloberfläche ausüben und somit die Umwandlung von *Fh* zu *Goe* bzw. *Häm* verhindern. Dahingegen zeigen einbasige wie *AcO* eine geringere adsorptive Wirkung und inhibieren die Umkristallisation nicht, was die Bildung von *Goe* bzw. *Häm* begünstigt [140]. Varela et al., 1994, beobachtete die Bildung von *Goe* aus *Fh* bei einer Zugabe von *AcO* [137]. die vermutlich durch Lösung und anschließende Fällung der gelösten Eisenionen erfolgt.

Ebenso existieren Beobachtungen, dass lösliches Fe^{2+} die Transformation von *Fh* zu kristallineren Mineralen wie *Lep* und *Goe* beschleunigt [141]. Ihre Entstehung ist bisher noch unklar. Boland et al., 2014, schlug folgenden Mechanismus vor: Fe^{2+} -Ionen binden sich an die Oberfläche von Ferrihydrit, wodurch es sofort zur Oxidation zu Fe^{3+} kommt. Die Elektronen werden nun zu einem anderen Eisen(III)hydroxid im *Fh*-Kristall transferiert und setzen anschließend Fe^{2+} -Ionen in die Lösung frei. Die frisch ausgefällten Fe^{3+} -Ionen formen den Kristallisationskeim für die Bildung eines sekundären Minerals und erleichtern damit die weitere Aufnahme von Fe^{2+} -Ionen aus der Lösung und bilden damit eine neue Oberfläche [141]. Die Bildung des sekundären Materials hängt von der Transportrate der Fe^{2+} -Ionen zur

Eisen(III)hydroxid-Oberfläche ab. Während bei einer schnellen Fe^{2+} -Ionen-Aufnahme bevorzugt *Goe* gebildet wird, entsteht bei einer langsamen Aufnahme *Lep* [141].

Liu et al., 2008, beobachteten, dass in Sulfat-reichen Medien unter Zugabe von Fe^{2+} -Ionen bevorzugt *Goe* gebildet wird, während sich *Lep* bevorzugt in einer Cl^- -reichen Umgebung bildet [26]. Es ist somit plausibel, dass die Entstehung von *Goe* in den Experimenten daran liegt, dass als Fe^{2+} -Ionen-Quelle $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ eingesetzt wurde. Ebenso beobachtete Liu et al., dass hohe Temperaturen und hoher pH (5 – 9) eine Transformation im festen Zustand zu *Goe* und *Häm* begünstigen, während bei niedrigen Temperaturen und niedrigen pH-Werten eine Lösung/Fällung stattfindet und damit die Bildung von *Lep* begünstigt wird [142]. Die angewendete Raumtemperatur und eine mögliche Senkung des pH-Wertes nach Zugabe von $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ könnte der Grund für die Entstehung von *Lep*-Banden sein.

Nach Zugabe von Fe^{2+} -Ionen, *AcO* und *Cys* unter Sauerstoffausschluss konnte die Bildung von *Magh* beobachtet werden. Auch Banden von *Lep* sind klar zu erkennen. Diese Kombination der Banden erhärtet den Verdacht, dass eine Dehydratation die Umwandlung von *Lep* zu *Magh* bewirkt hat. Denn *Häm* entsteht durch thermische Dehydratation aus *Goe* und *Lep*. Dabei erfolgt die Umwandlung von *Lep* zu *Häm* über *Magh* als Zwischenstufe, wohingegen sich *Goe* direkt ohne Zwischenstufe zu Hämatit umwandelt [23, 143]. Dies liegt vermutlich daran, dass *Goe/Häm* bzw. *Lep/Magh* einer ähnlichen Strukturgruppe angehören. Neben der Umkristallisation kann auch eine topotaktische Transformation erfolgen [24]. Es ist daher nicht ausgeschlossen, dass sich *Magh* als Teilschritt der eigentlichen Transformation von *Fh* zu *Häm* gebildet hat.

4.6 RAMAN-ANALYSE DES ENCAPSULIN-KOMPARTIMENTS

In Abschnitt 4.5 wurden Modelle zur reduktiven Transformation von *Fh* zu *Mag* entworfen. Eine partielle Umwandlung von *Fh* zu *Mag* konnte mittels eines Reduktionsmittels unter Zuhilfenahme eines Elektronen-Transportern und unter Sauerstoffausschluss erzielt werden. Die Umsetzung dieser Experimente auf Ferritin gestaltet sich allerdings als schwierig. Die Modelle eignen sich lediglich zur Bewertung, ob und inwieweit *Fh* zu *Mag* umgewandelt wird und welche Faktoren die Umwandlung beeinflussen. Bezüglich des Ferritins können überdies zelleigene und biochemische Faktoren, z.B. Proteine, hinzukommen.

Im Folgenden wurde am IBMI ermittelt, ob die Transformationen von *Fh* zu *Mag* auch enzymatisch durchgeführt werden können. Dazu wurde untersucht, ob und welche Proteine die Transformation auslösen.

Limitierend ist jedoch dabei die geringe Größe des Ferritins. Das Encapsulin-Kompartiment, auch beschrieben unter dem Namen Encapsulin-Proteinkäfig, ist dem Ferritin sehr ähnlich und eignet sich als Ersatz. Es handelt sich um eine kugelförmige bakterielle Organelle aus 180 Untereinheiten, die strukturelle Ähnlichkeiten mit HK97- Bakteriophagen aufweist. Das Encapsulin-Kompartiment hat einen äußeren und inneren Durchmesser von 32 nm bzw. 26 nm und gemeinsam haben Ferritin und das Encapsulin-Kompartiment, dass ihr Hohlraum einer Reaktionskammer gleichgesetzt werden kann. Ihre Funktion hängt jedoch von der Art der im Encapsulin-Kompartiment beladenen Proteine ab. Die Organelle besitzt Peroxidasen und Proteine, die dem Ferritin ähnlich sind. Ebenso können diverse Frachtproteine (sog. *Cargo*-Proteine) je nach Intention gezielt in das Kompartiment eingebracht werden. Um herauszufinden, welche Proteine oder Proteinkombinationen für die Transformation infrage kommen, sollen *Fh* beladene Encapsulin-Kompartimente mit geeigneten Proteinen in Verbindung gebracht werden. Die Charakterisierung der entstehenden Eisenspezies erfolgte mittels RM. Es wird geprüft, inwieweit eine Bandeninterpretation trotz der erhöhten Komplexität des Raman-Spektrums durch die Zunahme der biologischen Matrix in der Probe möglich ist. Dabei wurde auch Ferrihydrit in das Encapsulin-Kompartiment eingeschlossen. Die erstellten Raman-Spektren des Encapsulin-Kompartimentes sind in Abbildung 4.21 gezeigt.

Die Raman-Spektren von Encapsulin-Kompartiment zeigen eine weitaus geringere Komplexität als die in Abschnitt 4.4 gezeigten lysosomalen Proben. Die Proben zeigen die typischen Proteinbanden, wie zum Beispiel schwach die Phe-Ringatmungsbande bei 1001 cm^{-1} , C-H-Streckschwingungen bei 1460 cm^{-1} und C-H-Deformationsschwingungen bei $2800 - 3000\text{ cm}^{-1}$. Die Bande im Bereich von 730 cm^{-1} , die von Ferrihydrit stammen soll, konnte nicht erkannt werden. Der Einsatz langer Messzeiten führte nicht wie erhofft zur Zunahme der Intensität der relevanten Ferrihydrit-Bande, sondern zur Zersetzung der polymeren Puffersubstanz in kleinere Bestandteile. Es konnte gezeigt werden, dass zwar eine Raman-Analyse des Encapsulin-Kompartiments und damit die Charakterisierung des Eisenkerns möglich ist. Aber die Voraussetzung ist auch hier eine möglichst hohe Konzentration der Eisenverbindung. Das Encapsulin-Kompartiment ist dem Ferritin zwar strukturell ähnlich, jedoch ist der Anteil der biologischen Matrix im Encapsulin-Kompartiment höher und damit das Eisen-zu-Matrix-Verhältnis ungünstiger.

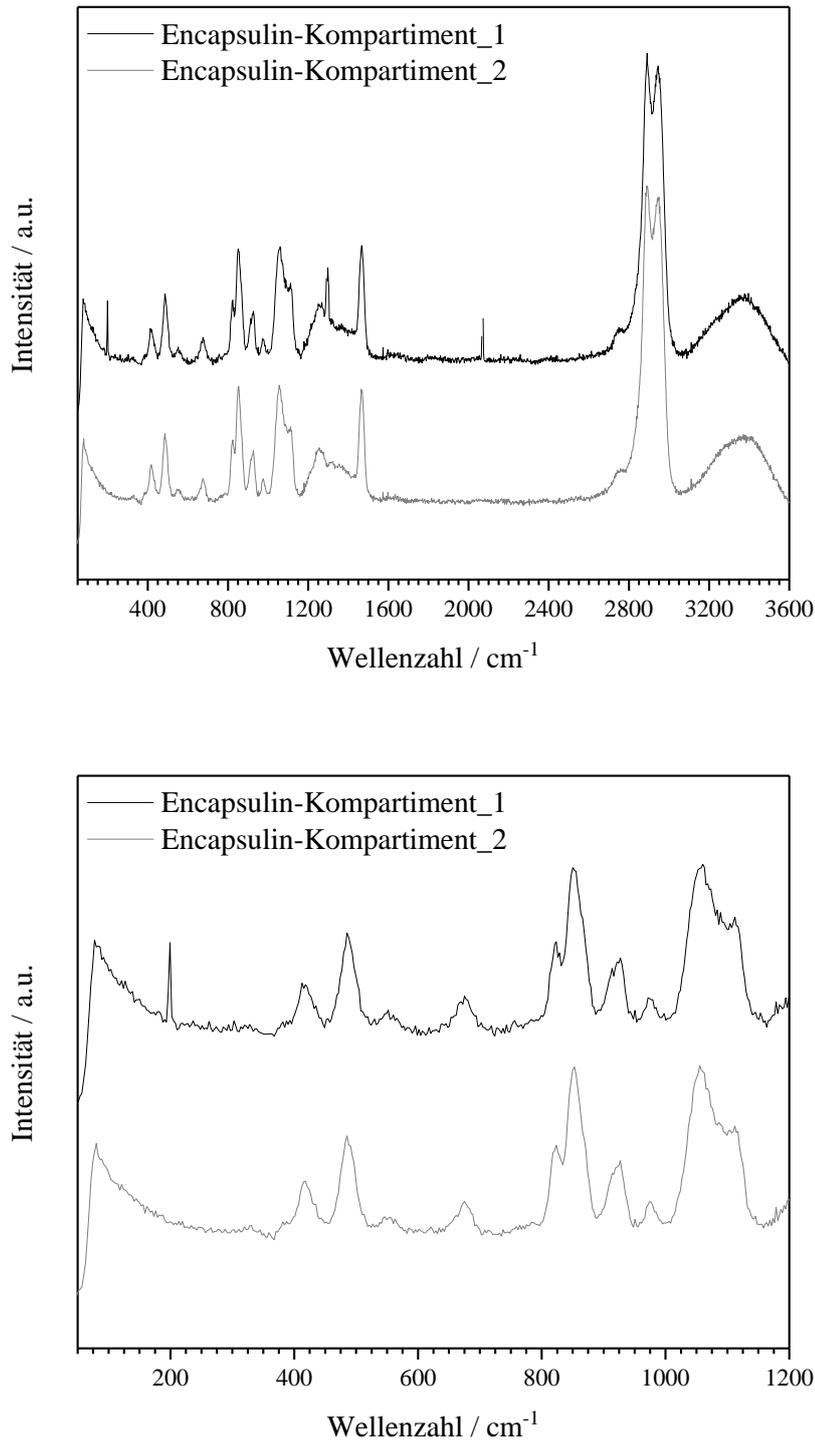


Abbildung 4.21: Raman-Spektren des Encapsulin-Kompartiments, die bei einer Wellenlänge von $\lambda_0 = 532 \text{ nm}$ mit einem 100 \times -Objektiv, einer Laserleistung von 1 mW und einer 10-fach akkumulierten Integrationszeit von 10 s aufgenommen wurden (a). Vergrößerte Ansicht der Raman-Spektren im Wellenlängenbereich 50 – 1200 cm⁻¹ (b).

5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung, inwiefern die Raman-Mikrospektroskopie für eine Charakterisierung der chemischen und strukturellen Zusammensetzung des Eisenkerns von Ferritin und Magnetoferritin befähigt ist.

Die Raman-Analyse des Eisenkerns im natürlichen Ferritin und Magnetoferritin erfolgte unter Zuhilfenahme geeigneter Referenzspektren und Vergleich mit Apoferritin, das der leeren Proteinschale entspricht, als Kontrollspektrum.

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurden Ferrihydrit ($\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 0,5 \text{H}_2\text{O}$), Magnetit (Fe_3O_4) und Maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)-Nanopartikel synthetisiert, mittels Raman-Mikrospektroskopie analysiert und mittels Mößbauer-Spektroskopie verifiziert. Letztere erlaubt durch die von Elektronen-Kern-Wechselwirkung resultierende Hyperfeinstruktur eine eindeutige Bestimmung der Art des Eisens (Fe^{2+} und Fe^{3+}). Damit war die eindeutige Charakterisierung von Ferrihydrit, Magnetit und Maghemit möglich. Mit Röntgenbeugungsspektroskopie (XRD) konnte nur eine vage Aussage zur Beschaffenheit der Referenzsubstanzen getroffen werden. Das lag zum einen daran, dass Magnetit und Maghemit aufgrund ihrer strukturellen Verwandtschaft ähnliche XRD-Muster geben. Die schwache Kristallinität des Ferrihydrits lieferte außerdem ein XRD-Muster mit sehr breiten Banden, dessen Interpretation uneindeutig ist.

Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse der Raman-Analyse von Ferritin und Magnetoferritin bekräftigen, dass die Raman-Mikrospektroskopie hohes Potenzial zur Identifizierung und Charakterisierung der Eisenform des Eisenkerns von Ferritin und Magnetoferritin besitzt. Obwohl Proteine ein komplexes Raman-Spektrum mit vielen und zum Teil sich selbst überlappenden Banden liefern, war es möglich hilfreiche Informationen über die chemische und strukturelle Zusammensetzung des Eisenkerns zu extrahieren. Im Raman-Spektrum von Ferritin und Magnetoferritin konnten zusätzliche Banden bei 730 cm^{-1} bzw. 665 cm^{-1} beobachtet werden, die in den Kontrollspektren ihrer entsprechenden Apoferritine nicht auftraten und somit dem Eisenkern zugeordnet werden konnten. Durch Vergleich der Referenzspektren deuten diese auf die Anwesenheit von Ferrihydrit in Ferritin und Magnetit in Magnetoferritin hin.

Im Vergleich mit den Methoden Mößbauer-Spektroskopie und XRD zeichnet sich die Raman-Mikrospektroskopie durch ihre zerstörungsfreie Unterscheidung der Mineralphasen

des Eisenkerns von Ferritin und Magnetoferritin aus. Ein weiterer entscheidender Vorteil ist die räumlich aufgelöste Analyse, die *in situ* und bei Raumtemperatur stattfinden kann.

Ein großer Nachteil der RM ist die Überlagerung der Analyt-Signale durch Fluoreszenz. Dies kann jedoch durch geeignete Wahl der richtigen Anregungswellenlänge λ_0 vermieden bzw. auf ein Minimum reduziert werden. Die Fluoreszenz trat insbesondere bei Ferritin- und Magnetoferritin-Proben auf. Die Fluoreszenz konnte mittels geeigneter Anregungswellenlänge λ_0 zwar minimiert werden, jedoch konnte ein Fluoreszenzuntergrund auch durch Verlängerung der Bestrahlungszeit nicht vollständig unterdrückt werden, was die Interpretation der Raman-Spektren erschwert. Insbesondere breite Banden, die simultan mit dem Fluoreszenzuntergrund auftreten, erscheinen in einem Raman-Spektrum als Schultern oder sehr breite schwache Banden und können somit leicht übersehen werden. Daher ist es wichtig zu beachten, dass Basislinienkorrekturen nicht unbedingt sinnvoll sind, da breite Banden, die in Form von Schultern erscheinen, eliminiert werden können.

Um eine eindeutige und aussagekräftige Raman-Analyse des Eisenkerns mit möglichst geringem Fluoreszenzuntergrund zu erreichen, ist die größtmögliche Erfassung des Proteins und Beseitigung störender Banden notwendig. Dazu ist die Entfernung potenzieller Störsubstanzen wie z.B. Matrixkomponenten und Puffersubstanzen erforderlich. Anhand der beobachteten Ergebnisse der Raman-Analyse von Ferritin und Magnetoferritin scheint die Aufreinigung der Probe maßgeblich zu einer Verbesserung beizutragen. Die von den Projektpartnern des *Institute of Biological and Medical Imaging* (IBMI) durchgeführte Aufreinigung von Magnetoferritin mittels Gelpermeationschromatografie und die Probenvorbereitung mittels *Amicon*[®] Ultra-Zentrifugeneinheiten bewirkten eine deutliche Verbesserung der Raman-Analyse von Ferritin und Magnetoferritin.

Darauf aufbauend wurde im nächsten Schritt die Durchführbarkeit der Raman-Analyse von in Zellen inkorporiertem Ferritin und Magnetoferritin getestet. Dazu wurden Ferritin und Magnetoferritin mittels eines semigenetischen Systems über genetisch kodierte Ferritin-Rezeptoren in Lysosomen transferiert. Diesen Prozess entwickelten die Projektpartner des IBMI. Die beladenen lysosomalen Proben wurden anschließend mittels Raman-Analyse untersucht. Allerdings zeigte sich, dass die Raman-Analyse zur Identifizierung der Eisenverbindungen aufgrund ihrer niedrigen Konzentration im Vergleich zum Anteil der vorhandenen biologischen Matrix deutlich erschwert wurde. Eine Detektion der Eisenspezies war trotz Reinigung und Konzentration der lysosomalen Proben nicht möglich.

Für die Raman-Analyse des Eisenkerns in Lysosomen als auch in weiteren Zellen scheint eine Mindestkonzentration an Eisen notwendig zu sein, die in diesen Proben nicht erreicht werden konnte.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden in Kooperation mit der Forschungsgruppe des IBMI weitere Ansätze zur Magnetoferritin-Herstellung untersucht. Inspiriert von der Umwandlung von Ferrihydrit zu Magnetit an den Zähnen der Käferschnecke *Acanthopleura hirtosa* soll diese für eine selbständige Umwandlung des Eisenkerns von Ferritin zum Magnetoferritin übertragen werden. Dazu wurden drei Modelle vorgeschlagen, die auf einer reduktiven Transformation basieren. Zu einer Ferrihydrit-Suspension wurden verschiedene Substanzen zugegeben, die als Reduktionsauslöser vermutet werden. Im ersten Modell erfolgte die alleinige Zugabe ausgewählter potenzieller Elektronendonatoren. Im zweiten Modell wurde zusätzlich zum Acetat ein Elektronen-Transporter Cystein, das in der Lage ist Fe^{3+} zu reduzieren, hinzugefügt. Im dritten Modell erfolgt die Zugabe von Fe^{2+} -Ionen. Fe^{2+} -Ionen werden in diesem Experiment einmal separat zugegeben und jeweils in Kombination mit Acetat und Acetat/Cystein. Die Raman-Analyse aller Experimente zeigte, dass die Zugabe der Substanzen wie Ascorbinsäure und Acetat, Elektronen-Transporter wie Cystein und Fe^{2+} -Ionen eine Umwandlung von Ferrihydrit in andere Eisenverbindungen auslöst. Am stärksten ist die Umwandlung von Ferrihydrit nach Zugabe von Ascorbinsäure. Diese bewirkte die Entstehung von Magnetit und eine Umkristallisierung von Ferrihydrit zu einem höher kristallinen Typ. Ascorbinsäure ist spezifisch für die Reduktion von Eisen und fungiert zudem als Sauerstofffänger. Diese Kombination scheint die Magnetitbildung zu begünstigen. Bei der Verwendung von Acetat konnte eine Änderung von Ferrihydrit nach Zugabe von Fe^{2+} oder Fe^{2+} /Cystein hauptsächlich zu Goethit und Lepidokrokit beobachtet werden. Wobei unter Sauerstoffausschluss zusätzlich von Magnetit und Maghemit erzeugte Banden in den Raman-Spektren beobachtet werden konnten. Acetat alleine zeigte keine wesentliche Wirkung. In Kombination mit Fe^{2+} -Ionen und Cystein wurde eine Umwandlung von Ferrihydrit ausgelöst. Fe^{2+} -Ionen und Cystein, insbesondere in Kombination, beschleunigten die Wirkung auf die Umwandlung von Goethit und Lepidokrokit und unter Sauerstoffausschluss auch zu Magnetit/Maghemit. Jedoch ist darauf hinzuweisen, dass Ferrihydrit als schwach kristallines Mineral mit der Zeit bevorzugt zu höher kristallinen Mineralen wie Goethit, Lepidokrokit und Hämatit umwandelt.

Die Übertragung dieser Ergebnisse auf Ferritin gestaltet sich allerdings schwierig, denn bei Proteinen und biologischen Komponenten kommen weitere Faktoren hinzu, wie z.B. Enzyme, die ebenfalls einen Einfluss auf die Umwandlung ausüben können. Eine vollständig

enzymatische oder teilenzymatische Umwandlung von Ferrihydrit zu Magnetit in Proteinen ist durchaus realistischer und genauer. Aus den Ergebnissen der Experimente konnten Hinweise für die Ermittlung des richtigen Enzyms für den Einsatz der Ferrihydrit-Transformation gezogen werden. So kann beispielsweise für die Verwendung von Reduktasen, die eine Elektronentransport-Einheit besitzen, eine erfolgreiche Umwandlung von Ferrihydrit zu Magnetit angenommen werden.

Am IBMI wurde das Encapsulin-Kompartiment zur Ermittlung des Enzyms, das die Umwandlung auslösen könnte, verwendet. Die Proben wurden anschließend mittels Raman-Mikrospektroskopie untersucht. In erster Linie wurde geprüft, inwiefern die Komplexität des Raman-Spektrums des Encapsulin-Kompartiments eine Analyse der Eisenverbindungen ermöglicht. Die ersten Raman-Spektren des Ferrihydrit-beladenen Encapsulin-Kompartimentes zeigten keine Banden des Eisenhydroxids. Vermutlich lässt es sich auf das niedrige Konzentrationsverhältnis von Eisen zur biologischen Matrix zurückführen. Durch weitere Optimierungen der Raman-Parameter besteht jedoch noch Potenzial für eine verbesserte Analyse.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Raman-Mikrospektroskopie für eine Analyse des Eisenkerns in Magnetoferritin und Ferritin geeignet ist. Eine Zuordnung der von den Eisenverbindungen stammenden markanten Bande bei 700 cm^{-1} ist möglich, da diese im Kontrollspektrum abwesend ist. Es gibt jedoch Optimierungsbedarf bei der Analyse von Ferritin und Magnetoferritin. Durch lange Messzeiten, um die auftretende Fluoreszenz zu unterdrücken, verliert hier die Raman-Mikrospektroskopie ihren Vorteil eine zeitsparende Technik zu sein.

Die Raman-Analysen der entsprechenden Apoferritine dagegen verliefen aufgrund der nicht auftretenden Fluoreszenz problemlos. Dadurch ist die Charakterisierung der in Apoferritin hergestellten Nanopartikel nach Inkorporation weiterer Substanzen wie Zink, Kupfer oder Mangan mittels Raman-Mikrospektroskopie möglich und somit ist der Einsatz der Raman-Mikrospektroskopie in der Nanotechnologie bei Biosynthese der Nanopartikel vielversprechend. Bei optimalen Raman-Parametern erlaubt die Raman-Mikrospektroskopie die Charakterisierung von Magnetoferritin als Kontrastmittel für bildgebende Verfahren wie der Magnetresonanztomografie, was für deren Verbesserung hilfreich werden könnte. Eine Weiterentwicklung der Raman-basierten Methode zu einer Analyse hinsichtlich einer räumlichen Auflösung im Nanometer-Bereich würden die Analyse eisenhaltiger Proteine und Zellen ermöglichen. Dies ist aufgrund der zielgenauen Analyse der Eisenverbindungen durch Erhöhung des Konzentrationsverhältnisses von Eisen zu der biologischen Matrix pro

Flächeneinheit möglich. *In vivo* Anwendungen zur zerstörungsfreien Untersuchung des Krankheitsverlaufes neurodegenerativer Krankheiten wie Alzheimer, Parkinson oder Huntington bzw. von Atherosklerose könnten von einer optimierten Raman-Analyse profitieren. So könnte die Raman-Mikrospektroskopie unterstützend zur Diagnostik oder zur Früherkennung eingesetzt werden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] A.K. Gupta, M. Gupta, Synthesis and Surface Engineering of Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications, *Biomaterials* **2005**, 26, 3995-4021.
- [2] K.M. Krishnan, Biomedical Nanomagnetism: a Spin Through Possibilities in Imaging, Diagnostics, and Therapy, *IEEE Transactions on Magnetics* **2010**, 46, 2523-2558.
- [3] C. Rügenapp, B. Gleich, A. Haase, Magnetic Nanoparticles in Magnetic Resonance Imaging and Diagnostics, *Pharmaceutical Research* **2012**, 29, 1165-1179.
- [4] M. Colombo, S. Carregal-Romero, M.F. Casula, L. Gutiérrez, M.P. Morales, I.B. Böhm, J.T. Heverhagen, D. Prospero, W.J. Parak, Biological Applications of Magnetic Nanoparticles, *Chemical Society Reviews* **2012**, 41, 4306-4334.
- [5] V. Clavijo Jordan, M.R. Caplan, K.M. Bennett, Simplified Synthesis and Relaxometry of Magnetoferritin for Magnetic Resonance Imaging, *Magnetic Resonance in Medicine* **2010**, 64, 1260-1266.
- [6] G.C. Ford, M. Harrison Pauline, D.W. Rice, J.M.A. Smith, A. Treffry, J.L. White, J. Yariv, Ferritin: Design and Formation of an Iron-Storage Molecule, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, Biological Sciences* **1984**, 304, 551-565.
- [7] D. He, J. Marles-Wright, Ferritin Family Proteins and their Use in Bionanotechnology, *New Biotechnology* **2015**, 32, 651-657.
- [8] E.C. Theil, Ferritin: The Protein Nanocage and Iron Biomineral in Health and in Disease, *Inorganic Chemistry* **2013**, 52, 12223-12233.
- [9] C. Massner, F. Sigmund, S. Pettinger, M. Seeger, C. Hartmann, N.P. Ivleva, R. Niessner, H. Fuchs, M.H. de Angelis, A. Stelzl, N.L. Koonakampully, H. Rolbieski, U. Wiedwald, M. Spasova, W. Wurst, V. Ntziachristos, M. Winklhofer, G.G. Westmeyer, Genetically Controlled Lysosomal Entrapment of Superparamagnetic Ferritin for Multimodal and Multiscale Imaging and Actuation with Low Tissue Attenuation, *Advanced Functional Materials* **2018**, 28, 1706793.
- [10] A.P. Lee, J. Webb, D.J. Macey, W. van Bronswijk, A.R. Savarese, G.C. de Witt, In Situ Raman Spectroscopic Studies of the Teeth of the Chiton *Acanthopleura Hirtosa*, *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* **1998**, 3, 614-619.

- [11] L. Yan, S. Zhang, P. Chen, H. Liu, H. Yin, H. Li, Magnetotactic Bacteria, Magnetosomes and their Application, *Microbiological Research* **2012**, 167, 507-519.
- [12] D. Hautot, Q.A. Pankhurst, N. Khan, J. Dobson, Preliminary Evaluation of Nanoscale Biogenic Magnetite in Alzheimer's Disease Brain Tissue, *Proceedings, Biological Sciences* **2003**, 270, 62-64.
- [13] B. Janus, M.S. Bućko, A. Chrobak, J. Wasilewski, M. Zych, Magnetic Characterization of Human Blood in the Atherosclerotic Process in Coronary Arteries, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2015**, 323, 479-485.
- [14] E.C. Dreaden, A.M. Alkilany, X. Huang, C.J. Murphy, M.A. El-Sayed, The Golden Age: Gold Nanoparticles for Biomedicine, *Chemical Society Reviews* **2012**, 41, 2740-2779.
- [15] M. Arruebo, R. Fernández-Pacheco, M.R. Ibarra, J. Santamaría, Magnetic Nanoparticles for Drug Delivery, *Nano Today* **2007**, 2, 22-32.
- [16] D. Vollath, F.D. Fischer, D. Holec, Surface Energy of Nanoparticles – Influence of Particle Size and Structure, *Beilstein Journal of Nanotechnology* **2018**, 9, 2265-2276.
- [17] E. Roduner, Size Matters: Why Nanomaterials Are Different, *Chemical Society Reviews* **2006**, 35, 583-592.
- [18] B. Issa, M.I. Obaidat, A.B. Albiss, Y. Haik, Magnetic Nanoparticles: Surface Effects and Properties Related to Biomedicine Applications, *International Journal of Molecular Sciences* **2013**, 14, 21266-21305.
- [19] D. Vollath, D.V. Szabó, Synthesis and Properties of Nanocomposites, *Advanced Engineering Materials* **2004**, 6, 117-127.
- [20] A.M. Jubb, H.C. Allen, Vibrational Spectroscopic Characterization of Hematite, Maghemite, and Magnetite Thin Films Produced by Vapor Deposition, *ACS Applied Materials & Interfaces* **2010**, 2, 2804-2812.
- [21] S.P. Schwaminger, D. Bauer, P. Fraga-García, F.E. Wagner, S. Berensmeier, Oxidation of Magnetite Nanoparticles: Impact on Surface and Crystal Properties, *CrystEngComm* **2017**, 19, 246-255.
- [22] R.M. Cornell, U. Schwertmann, The Iron Oxides, *Wiley-VCH*, Weinheim (D), **2003**.
- [23] Y. Cudennec, A. Lecerf, Topotactic Transformations of Goethite and Lepidocrocite into Hematite and Maghemite, *Solid State Sciences* **2005**, 7, 520-529.

- [24] Y. Cudennec, A. Lecerf, The Transformation of Ferrihydrite into Goethite or Hematite, Revisited, *Journal of Solid State Chemistry* **2006**, 179, 716-722.
- [25] R. K. Kukkadapu, J. M. Zachara, J. K. Fredrickson, S. C. Smith, A. C. Dohnalkova, C. K. Russell, Transformation of 2-Line Ferrihydrite to 6-Line Ferrihydrite under Oxic and Anoxic Conditions, *American Mineralogist* **2003**, 88, 1903-1914.
- [26] H. Liu, H. Guo, P. Li, Y. Wei, The Transformation of Ferrihydrite in the Presence of Trace Fe(II): The Effect of the Anionic Media, *Journal of Solid State Chemistry* **2008**, 181, 2666-2671.
- [27] L. Stagi, J.A. de Toro, A. Ardu, C. Cannas, A. Casu, S.S. Lee, P.C. Ricci, Surface Effects under Visible Irradiation and Heat Treatment on the Phase Stability of γ -Fe₂O₃ Nanoparticles and γ -Fe₂O₃-SiO₂ Core-Shell Nanostructures, *The Journal of Physical Chemistry C* **2014**, 118, 2857-2866.
- [28] U. Schwertmann, H. Stanjek, H.H. Becher, Long-Term In Vitro Transformation of 2-Line Ferrihydrite to Goethite/Hematite at 4, 10, 15 and 25°C, *Clay Minerals* **2004**, 39, 433-438.
- [29] U. Schwertmann, J. Friedl, H. Stanjek, From Fe(III) Ions to Ferrihydrite and then to Hematite, *Journal of Colloid and Interface Science* **1999**, 209, 215-223.
- [30] S. Babay, T. Mhiri, M. Toumi, Synthesis, Structural and Spectroscopic Characterizations of Maghemite γ -Fe₂O₃ Prepared by One-Step Coprecipitation Route, *Journal of Molecular Structure* **2015**, 1085, 286-293.
- [31] R.L. Rebodos, P.J. Vikesland, Effects of Oxidation on the Magnetization of Nanoparticulate Magnetite, *Langmuir* **2010**, 26, 16745-16753.
- [32] J.S. Salazar, L. Perez, O. de Abril, L.T. Phuoc, D. Ihiawakrim, M. Vazquez, J.-M. Greneche, S. Begin-Colin, G. Pourroy, Magnetic Iron Oxide Nanoparticles in 10–40 nm Range: Composition in Terms of Magnetite/Maghemite Ratio and Effect on the Magnetic Properties, *Chemistry of Materials* **2011**, 23, 1379-1386.
- [33] D.L.A. de Faria, S. Venâncio Silva, M.T. de Oliveira, Raman Microspectroscopy of some Iron Oxides and Oxyhydroxides, *Journal of Raman Spectroscopy* **1997**, 28, 873-878.
- [34] A. Nistler, C. Hartmann, C. Rügenapp, M. Opel, B. Gleich, N.P. Ivleva, R. Niessner, M. Seidel, Production and Characterization of Long-Term Stable Superparamagnetic Iron Oxide-Shell Silica-Core Nanocomposites, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2017**, 442, 497-503.

- [35] S. Xu, A.H. Habib, S.H. Gee, Y.K. Hong, M.E. McHenry, Spin Orientation, Structure, Morphology, and Magnetic Properties of Hematite Nanoparticles, *Journal of Applied Physics* **2015**, 117, 17A315, 1-3.
- [36] L. Suber, P. Imperatori, A. Mari, G. Marchegiani, M.V. Mansilla, D. Fiorani, W.R. Plunkett, D. Rinaldi, C. Cannas, G. Ennas, D. Peddis, Thermal Hysteresis of Morin Transition in Hematite Particles, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2010**, 12, 6984-6989.
- [37] W. Wu, Z. Wu, T. Yu, C. Jiang, W.-S. Kim, Recent Progress on Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Surface Functional Strategies and Biomedical Applications, *Science and Technology of Advanced Materials* **2015**, 16, 23501, 1-43.
- [38] F.M. Michel, L. Ehm, S.M. Antao, P.L. Lee, P.J. Chupas, G. Liu, D.R. Strongin, M.A.A. Schoonen, B.L. Phillips, J.B. Parise, The Structure of Ferrihydrite, a Nanocrystalline Material, *Science* **2007**, 316, 1726-1729.
- [39] P.M. Harrison, P. Arosio, The Ferritins: Molecular Properties, Iron Storage Function and Cellular Regulation, *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1996**, 1275, 161-203.
- [40] J.D. López-Castro, J.J. Delgado, J.A. Perez-Omil, N. Gálvez, R. Cuesta, R.K. Watt, J.M. Domínguez-Vera, A New Approach to the Ferritin Iron Core Growth: Influence of the H/L Ratio on the Core Shape, *Dalton Transactions* **2012**, 41, 1320-1324.
- [41] R. Rajeswari, R. Jothilakshmi, Magnetic Nanoparticles as Drug Carriers: Review, *Materials Science Forum* **2015**, 807, 1-12.
- [42] V.V. Mody, A. Cox, S. Shah, A. Singh, W. Bevins, H. Parihar, Magnetic Nanoparticle Drug Delivery Systems for Targeting Tumor, *Applied Nanoscience* **2014**, 4, 385-392.
- [43] Y. Wang, D.W. Grainger, Barriers to Advancing Nanotechnology to Better Improve and Translate Nanomedicines, *Frontiers of Chemical Science and Engineering* **2014**, 8, 265-275.
- [44] J. Niewoehner, B. Bohrmann, L. Collin, E. Urich, H. Sade, P. Maier, P. Rueger, Jan O. Stracke, W. Lau, Alain C. Tissot, H. Loetscher, A. Ghosh, P.-O. Freskgård, Increased Brain Penetration and Potency of a Therapeutic Antibody Using a Monovalent Molecular Transporter, *Neuron* **2014**, 81, 49-60.
- [45] D. Baumann, M. Rudin, Quantitative Assessment of Rat Kidney Function by Measuring the Clearance of the Contrast Agent Gd(DOTA) Using Dynamic MRI, *Magnetic Resonance Imaging* **2000**, 18, 587-595.

- [46] A. Stroh, C. Faber, T. Neuberger, P. Lorenz, K. Sieland, P.M. Jakob, A. Webb, H. Pilgrim, R. Schober, E.E. Pohl, C. Zimmer, In Vivo Detection Limits of Magnetically Labeled Embryonic Stem Cells in the Rat Brain Using High-Field (17.6 T) Magnetic Resonance Imaging, *NeuroImage* **2005**, 24, 635-645.
- [47] S.-H. Huang, R.-S. Juang, Biochemical and Biomedical Applications of Multifunctional Magnetic Nanoparticles: a Review, *Journal of Nanoparticle Research* **2011**, 13, 4411-4430.
- [48] B. Lin, J. Du, J. Wu, L. Yang, R. Jin, T. Shen, H. Ai, W. Zhu, C. Wu, Reduction of Polyethylenimine-Coated Iron Oxide Nanoparticles Induced Autophagy and Cytotoxicity by Lactosylation, *Regenerative Biomaterials* **2016**, 3, 223-229.
- [49] J.E. Riviere, Pharmacokinetics of Nanomaterials: an Overview of Carbon Nanotubes, Fullerenes and Quantum Dots, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* **2009**, 1, 26-34.
- [50] M. Levy, N. Luciani, D. Alloyeau, D. Elgrabli, V. Deveaux, C. Pechoux, S. Chat, G. Wang, N. Vats, F. Gendron, C. Factor, S. Lotersztajn, A. Luciani, C. Wilhelm, F. Gazeau, Long Term In Vivo Biotransformation of Iron Oxide Nanoparticles, *Biomaterials* **2011**, 32, 3988-3999.
- [51] Y.H. Bae, K. Park, Targeted Drug Delivery to Tumors: Myths, Reality and Possibility, *Journal of Controlled Release* **2011**, 153, 198-205.
- [52] Z. Lin, N.A. Monteiro-Riviere, J.E. Riviere, Pharmacokinetics of Metallic Nanoparticles, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* **2015**, 7, 189-217.
- [53] S.C. Andrews, The Ferritin-Like Superfamily: Evolution of the Biological Iron Storeman from a Rubrerythrin-Like Ancestor, *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* **2010**, 1800, 691-705.
- [54] N.E. Le Brun, A. Crow, M.E.P. Murphy, A.G. Mauk, G.R. Moore, Iron Core Mineralisation in Prokaryotic Ferritins, *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* **2010**, 1800, 732-744.
- [55] K. Fan, C. Cao, M. Liang, D. Lu, D. Yang, J. Feng, L. Song, M. Liang, X. Yan, Magnetoferritin Nanoparticles for Targeting and Visualizing Tumour Tissues, *Nature Nanotechnology* **2012**, 7, 459-464.
- [56] H. Yao, Y. Wang, S. Lovell, R. Kumar, A.M. Ruvinsky, K.P. Battaile, I.A. Vakser, M. Rivera, The Structure of the BfrB–Bfd Complex Reveals Protein–Protein

- Interactions Enabling Iron Release from Bacterioferritin, *Journal of the American Chemical Society* **2010**, 134, 13470-13481.
- [57] S. Nair, S.E. Finkel, Dps Protects Cells Against Multiple Stresses During Stationary Phase, *Journal of Bacteriology* **2004**, 186, 4192-4198.
- [58] R.A. Grant, D.J. Filman, S.E. Finkel, R. Kolter, J. Hogle, The Crystal Structure of Dps, a Ferritin Homolog that Binds and Protects DNA, *Nature Structural Biology* **1998**, 5, 294-303.
- [59] T. Haikarainen, A. Thanassoulas, P. Stavros, G. Nounesis, S. Haataja, A.C. Papageorgiou, Structural and Thermodynamic Characterization of Metal Ion Binding in *Streptococcus suis* Dpr, *Journal of Molecular Biology* **2011**, 405, 448-460.
- [60] M. Worwood, Ferritin, *Blood Reviews* **1990**, 4, 259-269.
- [61] H.N. Munro, M.C. Linder, Ferritin: Structure, Biosynthesis, and Role in Iron Metabolism, *Physiological Reviews* **1978**, 58, 317-396.
- [62] N.D. Chasteen, P.M. Harrison, Mineralization in Ferritin: An Efficient Means of Iron Storage, *Journal of Structural Biology* **1999**, 126, 182-194.
- [63] B. Chandramouli, C. Bernacchioni, D. Di Maio, P. Turano, G. Brancato, Electrostatic and Structural Bases of Fe²⁺ Translocation Through Ferritin Channels, *Journal of Biological Chemistry* **2016**, 291, 25617-25628.
- [64] N. Jian, M. Dowle, R.D. Horniblow, C. Tselepis, R.E. Palmer, Morphology of the Ferritin Iron Core by Aberration Corrected Scanning Transmission Electron Microscopy, *Nanotechnology* **2016**, 27, 46LT02, 1-7.
- [65] H. Yoshimura, Protein-Assisted Nanoparticle Synthesis, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2006**, 282-283, 464-470.
- [66] I. Yamashita, K. Iwahori, S. Kumagai, Ferritin in the Field of Nanodevices, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2010**, 1800, 846-857.
- [67] K. Iwahori, K. Yoshizawa, M. Muraoka, I. Yamashita, Fabrication of ZnSe Nanoparticles in the Apoferritin Cavity by Designing a Slow Chemical Reaction System, *Inorganic Chemistry* **2005**, 44, 6393-6400.
- [68] M. Uenuma, B. Zheng, T. Imazawa, M. Horita, T. Nishida, Y. Ishikawa, H. Watanabe, I. Yamashita, Y. Uraoka, Metal-Nanoparticle-Induced Crystallization of Amorphous Ge Film Using Ferritin, *Applied Surface Science* **2012**, 258, 3410-3414.
- [69] M. Okuda, K. Iwahori, I. Yamashita, H. Yoshimura, Fabrication of Nickel and Chromium Nanoparticles Using the Protein Cage of Apoferritin, *Biotechnology and Bioengineering* **2003**, 84, 187-194.

- [70] C.A. Butts, J. Swift, S.-g. Kang, L. Di Costanzo, D.W. Christianson, J.G. Saven, I.J. Dmochowski, Directing Noble Metal Ion Chemistry within a Designed Ferritin Protein, *Biochemistry* **2008**, 47, 12729-12739.
- [71] M. Kanekiyo, C.-J. Wei, H.M. Yassine, P.M. McTamney, J.C. Boyington, J.R.R. Whittle, S.S. Rao, W.-P. Kong, L. Wang, G.J. Nabel, Self-Assembling Influenza Nanoparticle Vaccines Elicit Broadly Neutralizing H1N1 Antibodies, *Nature* **2013**, 499, 102-106.
- [72] M. Uchida, M. Terashima, C.H. Cunningham, Y. Suzuki, D.A. Willits, A.F. Willis, P.C. Yang, P.S. Tsao, M.V. McConnell, M.J. Young, T. Douglas, A Human Ferritin Iron Oxide Nano-Composite Magnetic Resonance Contrast Agent, *Magnetic Resonance in Medicine* **2008**, 60, 1073-1081.
- [73] D.P. Cormode, P.A. Jarzyna, W.J.M. Mulder, Z.A. Fayad, Modified Natural Nanoparticles as Contrast Agents for Medical Imaging, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2010**, 62, 329-338.
- [74] A.J. Cole, A.E. David, J. Wang, C.J. Galbán, H.L. Hill, V.C. Yang, Polyethylene Glycol Modified, Cross-Linked Starch-Coated Iron Oxide Nanoparticles for Enhanced Magnetic Tumor Targeting, *Biomaterials* **2011**, 32, 2183-2193.
- [75] K.M. Bennett, H. Zhou, J.P. Sumner, S.J. Dodd, N. Bouraoud, K. Doi, R.A. Star, A.P. Koretsky, MRI of the Basement Membrane Using Charged Nanoparticles as Contrast Agents, *Magnetic Resonance in Medicine* **2008**, 60, 564-574.
- [76] C.W. Lee, S.I. Choi, S.J. Lee, Y.T. Oh, G. Park, N.Y. Park, K.A. Yoon, S. Kim, D. Kim, Y.H. Kim, J.S. Suh, The Effectiveness of Ferritin as a Contrast Agent for Cell Tracking MRI in Mouse Cancer Models, *Yonsei Medical Journal* **2017**, 58, 51-58.
- [77] M.J. Martínez-Pérez, R. de Miguel, C. Carbonera, M. Martínez-Júlvez, A. Lostao, C. Piquer, C. Gómez-Moreno, J. Bartolomé, F. Luis, Size-Dependent Properties of Magnetoferritin, *Nanotechnology* **2010**, 21, 465707, 1-14.
- [78] F.C. Meldrum, B.R. Heywood, S. Mann, Magnetoferritin: In Vitro Synthesis of a Novel Magnetic Protein, *Science* **1992**, 257, 522-523.
- [79] G. Mirabello, J.J.M. Lenders, N.A.J.M. Sommerdijk, Bioinspired Synthesis of Magnetite Nanoparticles, *Chemical Society Reviews* **2016**, 45, 5085-5106.
- [80] A. Dey, J.J.M. Lenders, N.A.J.M. Sommerdijk, Bioinspired Magnetite Formation from a Disordered Ferrihydrite-Derived Precursor, *Faraday Discussions* **2015**, 179, 215-225.

- [81] M. Szybowski, M. Koralewski, J. Karoń, L. Melnikowa, Micro-Raman Spectroscopy of Natural and Synthetic Ferritins and Their Mimetics, *Acta Physica Polonia A* **2015**, 127, 534-536.
- [82] K.S. Kim, D.J. Macey, J. Webb, S. Mann, Iron Mineralization in the Radula Teeth of the Chiton *Acanthopleura Hirtosa*, *Proceedings of the Royal Society of London, Series B Biological Sciences* **1989**, 237, 335-346.
- [83] M. Saunders, C. Kong, J.A. Shaw, D.J. Macey, P.L. Clode, Characterization of Biominerals in the Radula Teeth of the Chiton, *Acanthopleura Hirtosa*, *Journal of Structural Biology* **2009**, 167, 55-61.
- [84] A. Smekal, Zur Quantentheorie der Dispersion, *Naturwissenschaften* **1923**, 11, 873-875.
- [85] C.V. Raman, K.S. Krishnan, A New Type of Secondary Radiation, *Nature* **1928**, 121, 501-502.
- [86] M.P.A. Clark, R.J.H. Clark, Rutherford and Raman – Nobel Laureates Who Had Difficult Early Journeys to Success, *Journal of Raman Spectroscopy* **2011**, 42, 2173-2178.
- [87] E. Smith, G. Dent, Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach, *John Wiley & Sons*, Chichester (GB), **2005**.
- [88] E. Riedel, Anorganische Chemie, *De Gruyter*, Berlin (D), **2004**.
- [89] J.R. Ferraro, K. Nakamoto, C.W. Brown, Introductory Raman Spectroscopy, *Academic Press*, San Diego (USA), **2003**.
- [90] W. Otting, Der Raman-Effekt und seine analytische Anwendung, *Springer*, Berlin (D), **1952**.
- [91] M. Prochazka, Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Bioanalytical, Biomolecular and Medical Applications, *Springer International Publishing*, Cham (CH), **2016**.
- [92] R.L. McCreery, Raman Spectroscopy for Chemical Analysis, *Measurement Science and Technology* **2001**, 1, 653-654.
- [93] A.A. Bunaciu, H. Aboul-Enein, V. Hoang, Raman Spectroscopy for Protein Analysis, *Applied Spectroscopy Reviews* **2015**, 50, 377-386.
- [94] D. Halliday, R. Resnick, J. Walker, S.W. Koch, Halliday Physik, *Wiley-VCH*, Weinheim (D), **2009**.
- [95] M. Hanesch, Raman Spectroscopy of Iron Oxides and (Oxy)hydroxides at Low Laser Power and Possible Applications in Environmental Magnetic Studies, *Geophysical Journal International* **2009**, 177, 941-948.

- [96] J.L. Verble, Temperature-Dependent Light-Scattering Studies of the Verwey Transition and Electronic Disorder in Magnetite, *Physical Review B* **1974**, 9, 5236-5248.
- [97] L.V. Gasparov, D.B. Tanner, D.B. Romero, H. Berger, G. Margaritondo, L. Forró, Infrared and Raman Studies of the Verwey Transition in Magnetite, *Physical Review B* **2000**, 62, 7939-7944.
- [98] L. Brooker, A.P. Lee, D. Macey, J. Webb, W. Van Bronswijk, In Situ Studies of Biomineral Deposition in the Radula Teeth of Chitons of the Suborder Chitonina, *Venus* **2006**, 65, 71-80.
- [99] R. Tuma, Raman Spectroscopy of Proteins: from Peptides to Large Assemblies, *Journal of Raman Spectroscopy* **2005**, 36, 307-319.
- [100] A. Rygula, K. Majzner, K.M. Marzec, A. Kaczor, M. Pilarczyk, M. Baranska, Raman Spectroscopy of Proteins: a Review, *Journal of Raman Spectroscopy* **2013**, 44, 1061-1076.
- [101] J.T. Pelton, L.R. McLean, Spectroscopic Methods for Analysis of Protein Secondary Structure, *Analytical Biochemistry* **2000**, 277, 167-176.
- [102] Horiba Scientific, Raman Spectroscopy for Proteins, http://www.horiba.com/fileadmin/uploads/Scientific/Documents/Raman/HORIBA_webinar_proteins.pdf., zuletzt aufgerufen am 22.06.2019
- [103] R. P. Kengne-Momo, P. Daniel, F. Lagarde, Y. Jeyachandran, J.-F. Pilard, M. Durand, G. Thouand, Protein Interactions Investigated by the Raman Spectroscopy for Biosensor Applications, *International Journal of Spectroscopy* **2012**, 1-7.
- [104] C. Matthäus, B. Bird, M. Miljković, T. Chernenko, M. Romeo, M. Diem, Infrared and Raman Microscopy in Cell Biology, *Methods in Cell Biology* **2008**, 89, 275-308.
- [105] C.E. Mortimer, U. Müller, Chemie: Das Basiswissen der Chemie, *Thieme*, Stuttgart (D), **2010**.
- [106] N. Abdus-Salam, F.A. M'Civer, Synthesis, Characterization and Application of 2-Line and 6-Line Ferrihydrite to Pb(II) Removal from Aqueous Solution, *Journal of Applied Sciences and Environmental Management* **2012**, 16, 327-336.
- [107] K. Petcharoen, A. Sirivat, Synthesis and Characterization of Magnetite Nanoparticles via the Chemical Co-Precipitation Method, *Materials Science and Engineering: B* **2012**, 177, 421-427.
- [108] Amicon®Ultra 0,5 mL Centrifugal Filters, Merck GmbH.
<http://www.merckmillipore.com/DE/de/life-science-research/protein-sample->

- preparation/protein-concentration/amicon-ultra-centrifugal-filters/0-5-ml/ytSb.qB.gZIAAAFBQHplvyxn.nav, zuletzt aufgerufen am 22.06.2019.
- [109] L. Ashton, V.L. Brewster, E. Correa, R. Goodacre, Detection of Glycosylation and Iron-Binding Protein Modifications Using Raman Spectroscopy, *Analyst* **2017**, 142, 808-814.
- [110] N. Lee, P.J. Schuck, P.S. Nico, B. Gilbert, Surface Enhanced Raman Spectroscopy of Organic Molecules on Magnetite (Fe₃O₄) Nanoparticles, *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2015**, 6, 970-974.
- [111] I.V. Chernyshova, M.F. Hochella Jr, A.S. Madden, Size-Dependent Structural Transformations of Hematite Nanoparticles – 1. Phase Transition, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2007**, 9, 1736-1750.
- [112] N. Griffete, A. Lamouri, F. Herbst, N. Felidj, S. Ammar, C. Mangeney, Synthesis of Highly Soluble Polymer-Coated Magnetic Nanoparticles Using a Combination of Diazonium Salt Chemistry and the Iniferter Method, *RSC Advances* **2012**, 2, 826-830.
- [113] N.P. Ivleva, S. Huckele, B. Weinzierl, R. Niessner, C. Haisch, T. Baumann, Identification and Characterization of Individual Airborne Volcanic Ash Particles by Raman Microspectroscopy, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2013**, 405, 9071-9084.
- [114] C. Rünenapp, F.E. Wagner, B. Gleich, Monitoring of the Aging of Magnetic Nanoparticles Using Mössbauer Spectroscopy, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2015**, 380, 241-245.
- [115] U.S. Enver Murad, The Mössbauer Spectrum of Ferrihydrite and its Relations to those of Other Iron Oxides, *American Mineralogist* **1980**, 65, 1044-1049.
- [116] E. Murad, The Mössbauer Spectrum of “Well”-Crystallized Ferrihydrite, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **1988**, 74, 153-157.
- [117] R. J. Pollard, Characterization of FeOOH Polymorphs and Ferrihydrite Using Low-Temperature, Applied-Field, Mössbauer Spectroscopy, *Clay Minerals* **1992**, 27, 57-71.
- [118] H.J. Butler, L. Ashton, B. Bird, G. Cinque, K. Curtis, J. Dorney, K. Esmonde-White, N.J. Fullwood, B. Gardner, P.L. Martin-Hirsch, M.J. Walsh, M.R. McAinsh, N. Stone, F.L. Martin, Using Raman Spectroscopy to Characterize Biological Materials, *Nature Protocols* **2016**, 11, 664-687.

- [119] Y. El Mendili, F. Grasset, N. Randrianantoandro, N. Nerambourg, J.-M. Greneche, J.-F. Bardeau, Improvement of Thermal Stability of Maghemite Nanoparticles Coated with Oleic Acid and Oleylamine Molecules: Investigations under Laser Irradiation, *The Journal of Physical Chemistry C* **2015**, 119, 10662-10668.
- [120] O.N. Shebanova, P. Lazor, Raman Spectroscopic Study of Magnetite (FeFe₂O₄): a New Assignment for the Vibrational Spectrum, *Journal of Solid State Chemistry* **2003**, 174, 424-430.
- [121] A.F. Palonpon, M. Sodeoka, K. Fujita, Molecular Imaging of Live Cells by Raman Microscopy, *Current Opinion in Chemical Biology* **2013**, 17, 708-715.
- [122] R.M. Solbrig, L.L. Duff, D.F. Shriver, I.M. Klotz, Raman and Infrared Spectroscopy of the Oxo-Bridged Iron(III) Complex, [Cl₃Fe-O-FeCl₃]-2 as a Spectroscopic Model for the Oxo Bridge in Hemerythrin and Ribonucleotide Reductase, *Journal of Inorganic Biochemistry* **1982**, 17, 69-74.
- [123] J.E. Plowman, T.M. Loehr, C.K. Schauer, O.P. Anderson, Crystal and Molecular Structure of the (μ-Oxo)bis[aquobis(phenanthroline)iron(III)] Complex, a Raman Spectroscopic Model for the Binuclear Iron Site in Hemerythrin and Ribonucleotide Reductase, *Inorganic Chemistry* **1984**, 23, 3553-3559.
- [124] J. Wang, D.L. Rousseau, H.M. Abu-Soud, D.J. Stuehr, Heme Coordination of NO in NO Synthase, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1994**, 91, 10512-10516.
- [125] G.C. Papaefthymiou, The Mössbauer and Magnetic Properties of Ferritin Cores, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2010**, 1800, 886-897.
- [126] B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, P. Walter, L. Nover, P. von Koskull-Döring, Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie, Wiley-VCH, Weinheim (D), **2005**.
- [127] D.F. Call, B.E. Logan, Lactate Oxidation Coupled to Iron or Electrode Reduction by *Geobacter Sulfurreducens* PCA, *Applied and Environmental Microbiology* **2001**, 77, 8791-8794.
- [128] E. Dalla Vecchia, E.I. Suvorova, J. Maillard, R. Bernier-Latmani, Fe(III) Reduction During Pyruvate Fermentation by *Desulfotomaculum Reducens* Strain MI-1, *Geobiology* **2014**, 12, 48-61.
- [129] N. Finke, V. Vandieken, B.B. Jørgensen, Acetate, Lactate, Propionate, and Isobutyrate as Electron Donors for Iron and Sulfate Reduction in Arctic Marine Sediments, Svalbard, *FEMS Microbiology Ecology* **2007**, 59, 10-22.

- [130] D.R. Lovley, E.J. Phillips, F. Caccavo, Acetate Oxidation by Dissimilatory Fe(III) Reducers, *Applied and Environmental Microbiology* **1992**, 58, 3205-3208.
- [131] M.J. Hynes, D.F. Kelly, The Reduction of Iron(III) by Ascorbic Acid, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1988**, 13, 849-850.
- [132] J.-S. Lee, Y. Chang, E.-S. Lee, H.-G. Song, P.-S. Chang, J. Han, Ascorbic Acid-Based Oxygen Scavenger in Active Food Packaging System for Raw Meatloaf, *Journal of Food Science* **2018**, 83, 682-688.
- [133] K.P. Nevin, D.R. Lovley, Potential for Nonenzymatic Reduction of Fe(III) Via Electron Shuttling in Subsurface Sediments, *Environmental Science & Technology* **2000**, 34, 2472-2478.
- [134] V. Barrn, J. Torrent, Evidence for a Simple Pathway to Maghemite in Earth and Mars Soils, *Geochimica et Cosmochimica Acta* **2002**, 66, 2801-2806.
- [135] A.S. Campbell, U. Schwertmann, P.A. Campbell, Formation of Cubic Phases on Heating Ferrihydrite, *Clay Minerals* **1997**, 32, 615-622.
- [136] S. Das, M.J. Hendry, J. Essilfie-Dughan, Transformation of Two-Line Ferrihydrite to Goethite and Hematite as a Function of pH and Temperature, *Environmental Science & Technology* **2011**, 45, 268-275.
- [137] M.d.C.R. Varela, M.F.d.J. Filho, F. Galembeck, Effect of Acetate on Ferrihydrite Crystallization, *Hyperfine Interactions* **1994**, 83, 159-167.
- [138] U. Schwertmann, E. Murad, Effect of pH on the Formation of Goethite and Hematite from Ferrihydrite, *Clays and Clay Minerals* **1983**, 31, 277-284.
- [139] R.M. Cornell, Comparison and Classification of the Effects of Simple Ions and Molecules upon the Transformation of Ferrihydrite into More Crystalline Products, *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* **1987**, 150, 304-307.
- [140] U. Schwertmann, Der Einfluss einfacher organischer Anionen auf die Bildung von Goethit und Hämatit aus amorphen Fe(III) - Hydroxid, *Geoderma* **1970**, 3, 207-214.
- [141] D.D. Boland, R.N. Collins, C.J. Miller, C.J. Glover, T.D. Waite, Effect of Solution and Solid-Phase Conditions on the Fe(II)-Accelerated Transformation of Ferrihydrite to Lepidocrocite and Goethite, *Environmental Science & Technology* **2014**, 48, 5477-5485.
- [142] H. Liu, P. Li, M. Zhu, Y. Wei, Y. Sun, Fe(II)-Induced Transformation from Ferrihydrite to Lepidocrocite and Goethite, *Journal of Solid State Chemistry* **2007**, 180, 2121-2128.

- [143] L. Mazzetti, P.J. Thistlethwaite, Raman Spectra and Thermal Transformations of Ferrihydrite and Schwertmannite, *Journal of Raman Spectroscopy* **2002**, 33, 104-111.

A. ANHANG

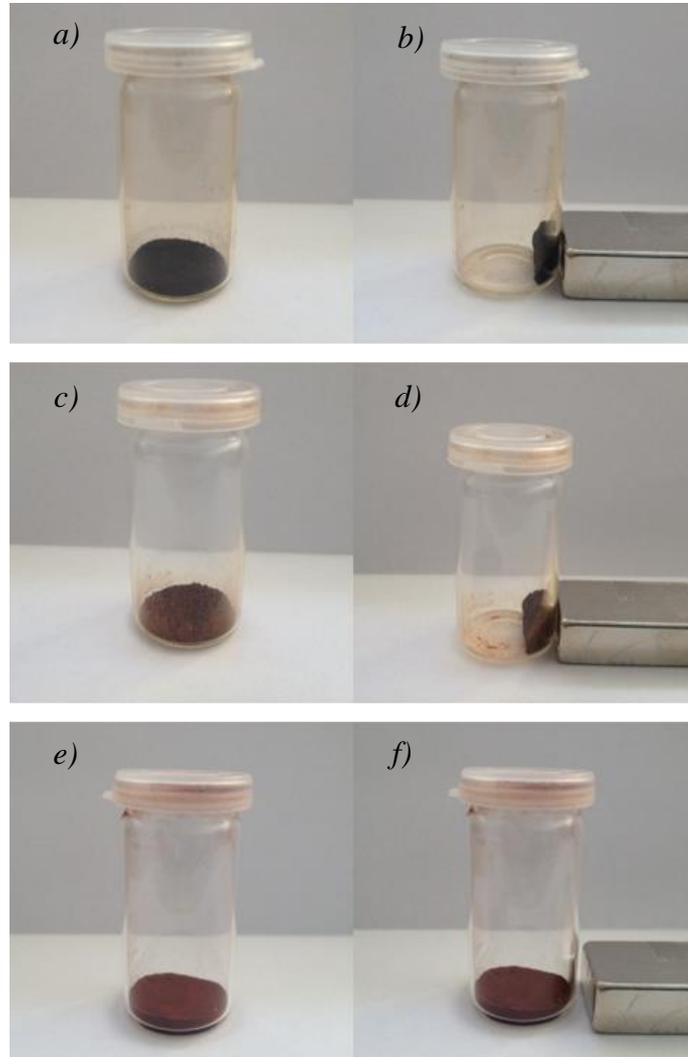


Abbildung A1: Synthesierte Nanopartikel von Magnetit (a, b), Maghemit (c, d) und Ferrihydrit (e, f). Die schwarzen Magnetit-NP und braunen Maghemit-NP werden von einem Permanentmagneten angezogen (b, d). Die rotbraunen Ferrihydrit-NP zeigen keine magnetischen Eigenschaften in Anwesenheit eines Permanentmagneten (f).

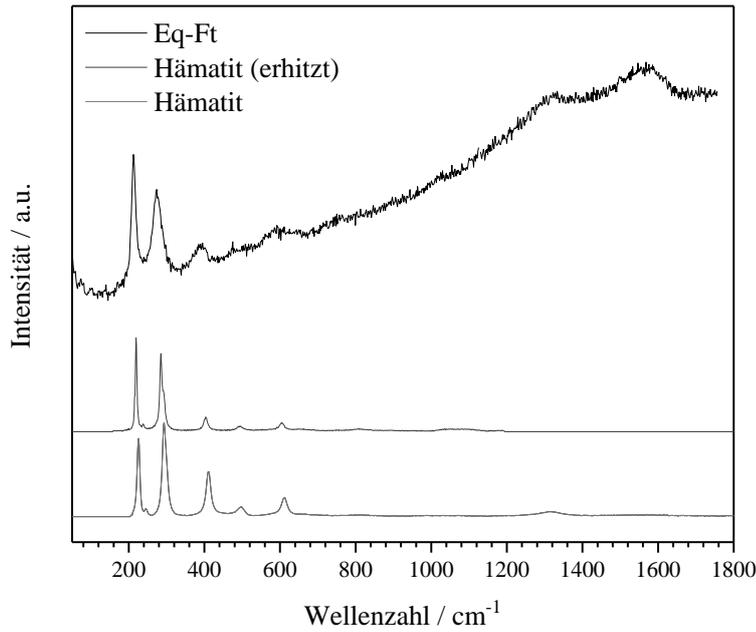


Abbildung A2: Raman-Spektrum von Ferritin aus der Pferdemilz (Eq-Ft, oben). Erhitzter Hämatit (Mitte) und Hämatit (Unten) stammen aus der im LabRAM HR gekoppelten Datenbank „SpectralID 3.03“ (Thermo Scientific, USA). Die Banden im Raman-Spektrum des Eisenkerns von erhitztem Ferritin können durch Vergleich der Bandenpositionen dem erhitzten Hämatit zugeordnet werden.

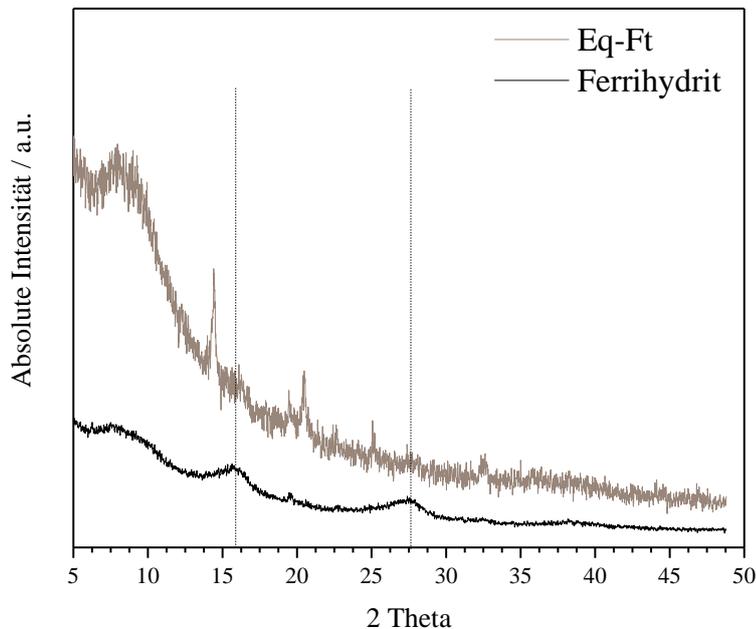


Abbildung A3: XRD-Analyse von Eq-Ft (oben) und Ferrihydrit (unten). Die gefriergetrockneten Proteinkomponenten geben offensichtlich Signale und erschweren somit die akkurate Identifikation des Eisenkerns in Eq-Ft.

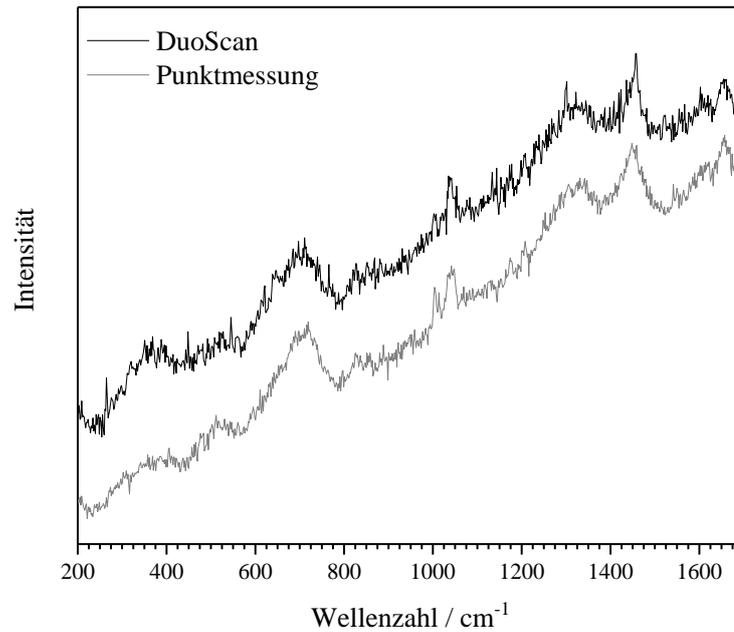


Abbildung A4: Raman-spektroskopische Aufnahme von Magnetoferritin (MfT). Die gleiche Stelle wurde bei gleichen Raman-Bedingungen einmal mittels DuoScan und Punktmessung durchgeführt. Es sind keine relevanten Unterschiede zu erkennen. Bei der Punktmessung ist das Rauschen im Vergleich zum DuoScan minimiert.

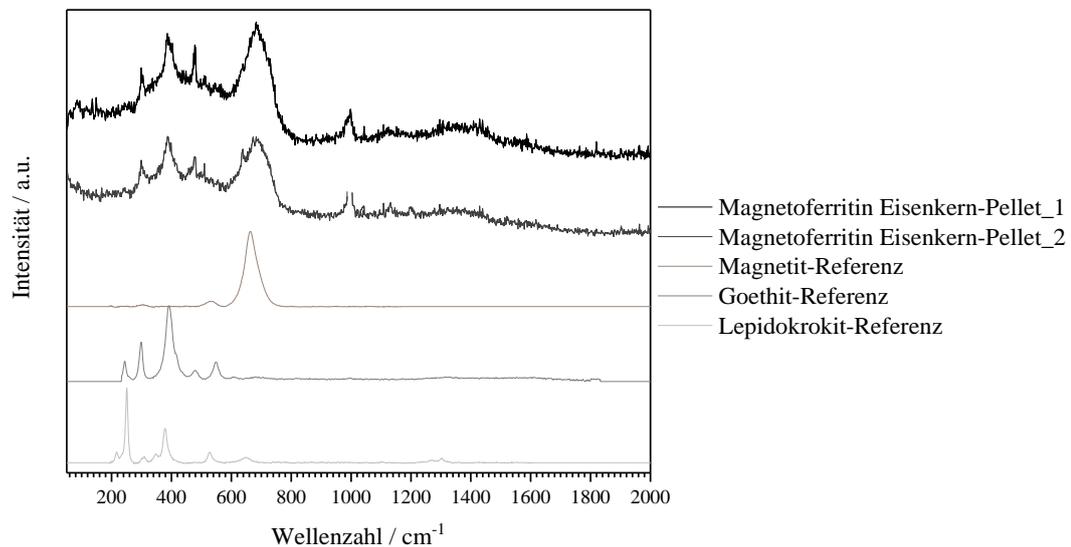


Abbildung A5: Raman-spektroskopische Aufnahmen der Eisenkern-Pellets. Zuvor wurde die Proteinhülle entfernt. Banden von Goethit sind zu erkennen. Die Entstehung von Goethit mag durch die hohen Oberflächeneffekte des nanokristallinen Ferrihydrites hervorgerufen werden.

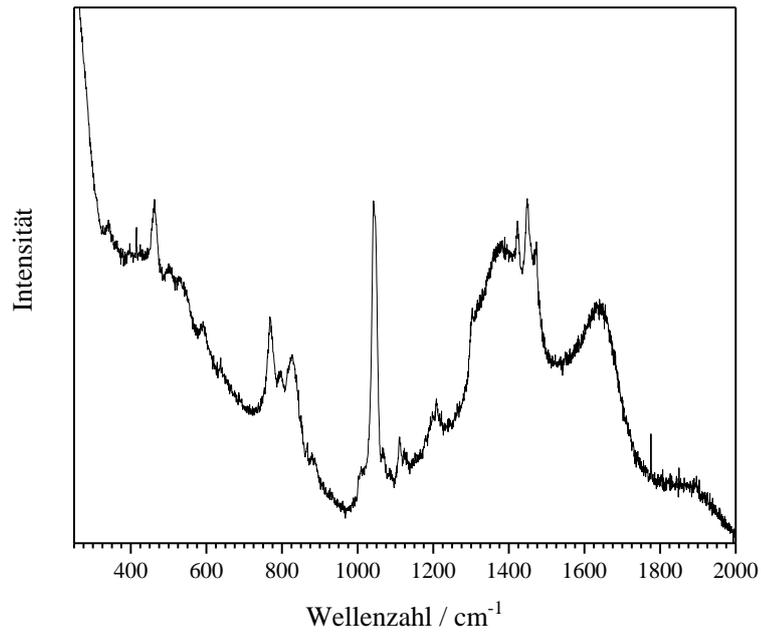


Abbildung A6: Raman-spektroskopische Aufnahme von MFt mittels 100×-Wasser-immersionsobjektiv. Proteinspezifische Banden sind schwer zu erkennen. Die Ermittlung der Eisenspezies ist offensichtlich durch das niedrige Konzentrationsverhältnis von Eisen zum Protein in Wasser erschwert.

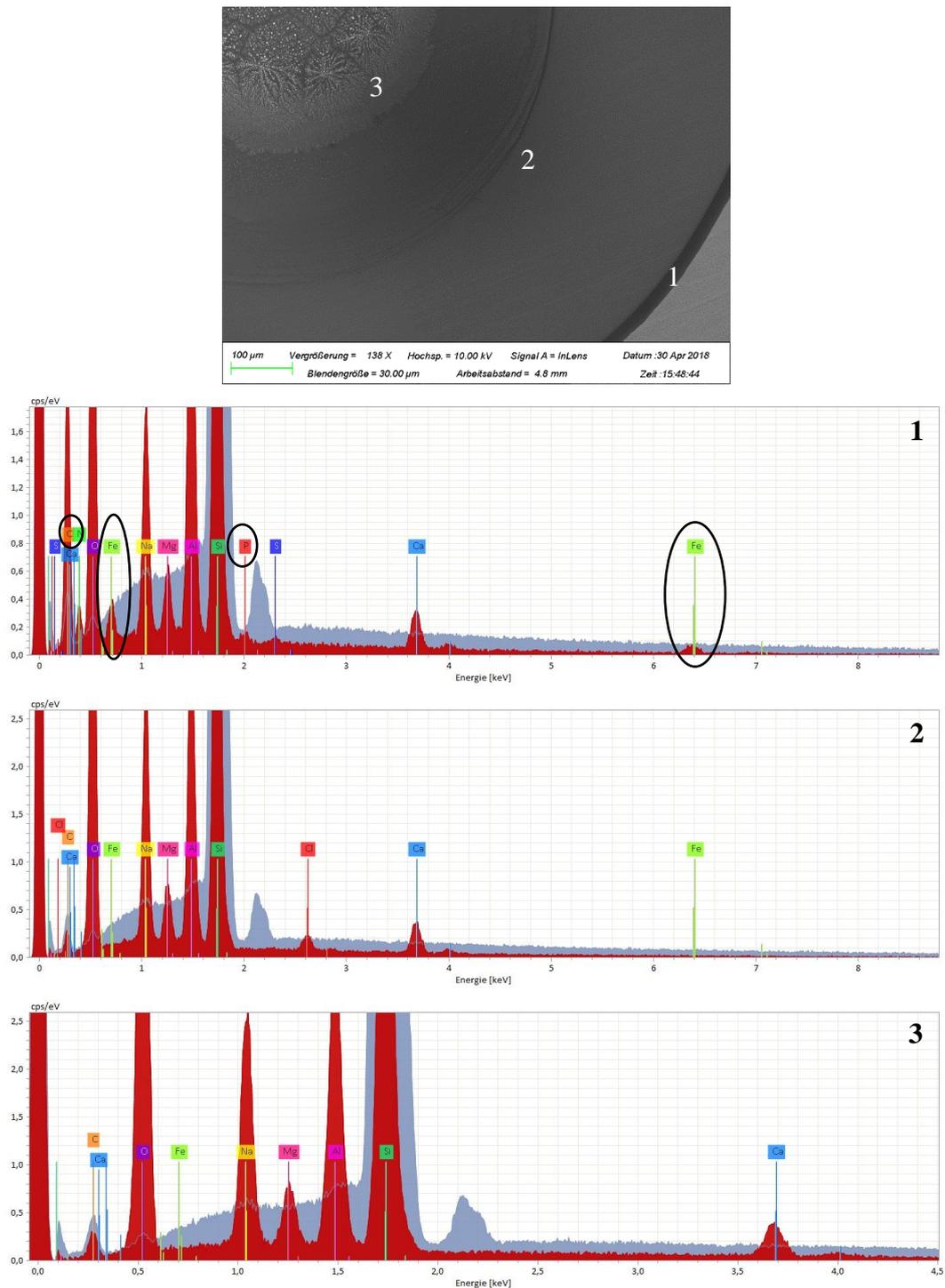


Abbildung A7: REM-Aufnahme von einem 1 µl-Aliquot der MfT-Probe auf dem Aluminiumglaträger. Die EDX-Aufnahme ermittelt die an der Stelle vorhandenen Elemente. Die Anwesenheit von Eisen (Fe), Kohlenstoff (C) und Phosphor (P) im EDX-Spektrum 1 weist auf die Anwesenheit von MfT am Tropfenrand hin.

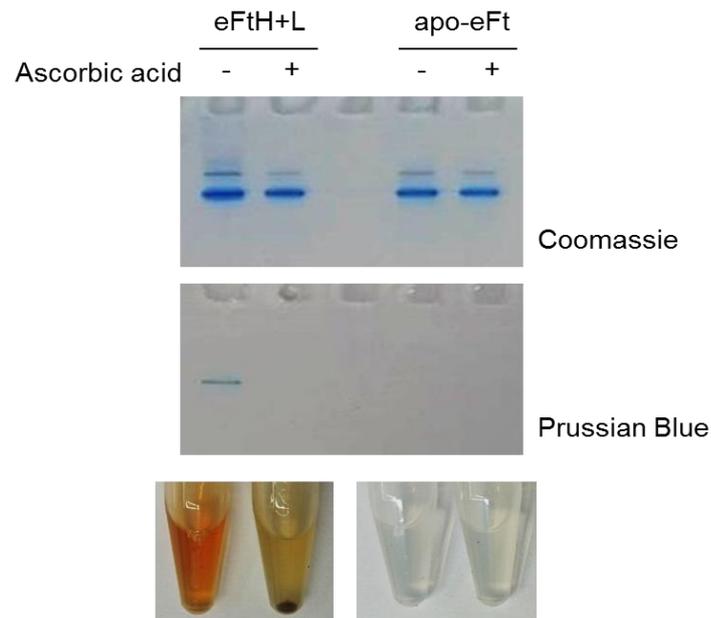


Abbildung A8: Ferritin (eFtH+L) und Apoferritin (apo-eFt) wurden jeweils mit Ascorbinsäure versetzt. Coomassie-Blauverfärbung des Native-PAGE zeigt bei allen vier Fällen das intakte Protein an. Preußisch-Blau dient zum Nachweis von Eisen. In Ferritin konnte mit Preußisch-Blau Eisen nachgewiesen werden. Nach Zugabe von Ascorbinsäure wird das Eisen entfernt, wobei die Proteinhülle intakt bleibt (Blauverfärbung durch Coomassie). Auf das Apoferritin hat Ascorbinsäure keinen Einfluss. (Mit Genehmigung von Susanne Pettinger, Department of Nuclear Medicine, TUM School of Medicine, Institute of Biological and Medical Imaging IBMI, Helmholtz Zentrum München)

B CHEMIKALIEN UND MATERIALIEN

B.1 CHEMIKALIEN

- Ammoniaklösung 25 % (Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland)
- Ammoniumacetat (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deutschland)
- Apoferritin von Equine Spleen (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deutschland)
- Calcium-L-Lactat Pentahydrat (Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland)
- Eisen(III)chlorid-Hexahydrat (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deutschland)
- Eisen(II)chlorid-Tetrahydrat (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deutschland)
- Eisen(III)nitrat-Nonahydrat (Merck KGaA, Deutschland)
- Eisen(II)sulfat-Heptahydrat (Merck KGaA, Deutschland)
- Ethanol 96 % (Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland)
- Ferritin von Equine Spleen (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deutschland)
- 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, HEPES, (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deutschland)
- Kaliumhydroxid (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deutschland)
- L(+)-Ascorbinsäure (Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland)
- L-Cystein (Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland)
- Natriumchlorid (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deutschland)
- Natriumcitrat (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deutschland)
- Natriumpyruvat, (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deutschland)
- Ölsäure (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deutschland)
- Trimethylamin N-oxid (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deutschland)
- Wasserstoffperoxid 30 % (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deutschland)

B.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN

- Aluminium-beschichteter Objektträger, 76 × 26 mm (EMF Dynasil, USA)
- Amicon[®]Ultra-Zentrifugeneinheiten, 30 kDa, (Merck KGaA, Deutschland)
- Becherglas, 250 ml (Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland)
- Dialysierschlauch Membra-Cel[™] aus regenerierter Cellulose, 6 mm, Ausschlussgrenze (MWCO) 14000 (Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland)

Dreihals- Rundkolben, 100 ml; Durchmesser NS: 1 × 29/32 und 2 × 14/23 mm (Schott AG, Deutschland)

Einmalkanülen, Sterican® 120 mm (B. Braun Melsungen AG, Deutschland)

Einmalkanülen, Sterican® 40 mm (B. Braun Melsungen AG, Deutschland)

Einmalspritzen, Injekt® 5 ml (B. Braun Melsungen AG, Deutschland)

Einmalspritzen, Injekt® 10 ml (B. Braun Melsungen AG, Deutschland)

Einmalspritzen, Injekt® 20 ml (B. Braun Melsungen AG, Deutschland)

Einmalspritzen, Omnifix® 1 ml (B. Braun Melsungen AG, Deutschland)

Exsikkator Rotilabo® (Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland)

Gewindeflaschen, aus Braunglas, 100 ml (Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland)

Gewindeflaschen, aus Klarglas, 100 ml (Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland)

Gewindeflaschen, aus Klarglas, 250 ml (Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland)

Gummistopfen mit umstülpbarem Rand, Durchmesser unten 14,2 mm, oben 15,5 mm für NS 14 (Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland)

Gummistopfen mit umstülpbarem Rand, Durchmesser unten 28 mm, oben 31,4 mm für NS 29 (Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland)

Objektträger aus Kalk-Natron-Glas, 76 × 26 mm (Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland)

Parafilm® M (Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland)

Pasteurpipetten, 230 mm (Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland)

Rollrandgläser aus Kalk-Soda-Glas, 5 ml (Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland)

Rotilabo®-Zentrifugenröhrchen, PP, 50 ml (Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland)

Schnappdeckel, PE, Durchmesser 18 mm (Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland)

B.3 GERÄTE

Gefriertrockner (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Deutschland)

Heizrührer IKA RH basic (IKA-Werke GmbH & Co. KG)

ICP-MS Elan 6100 (PerkinElmer, USA)

Laborwaage (Sartorius, Deutschland)

Leitfähigkeitsmessgerät Multi340i (WTW, Deutschland)

Muffelofen MR 170 (Heraeus GmbH, Deutschland)

pH-Messgerät Five Easy (Mettler Toledo, USA)

Pipetten 1000 µl, 200 µl, 100 µl (Eppendorf, Deutschland)

Pipetten 1000 µl, 200 µl, 100 µl (Eppendorf, Deutschland)

Raman-Mikroskop alpha300R (WITec, Deutschland)

Raman-Mikroskop LabRAM System (Horiba, Frankreich)

Reinstwasseranlage Millipore-Q Plus 185 (Merck Millipore, USA)

Spritzenpumpe 11 Plus (Harvard Apparatus, USA)

Überkopfschüttler REAX 2 (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Deutschland)

ZEISS SIGMA VP Field Emission Scanning Electron Microscope (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland)

Zentrifuge 5804R (Eppendorf, Deutschland)

B.4 SOFTWARE

ControlFive (WITec GmbH, Deutschland)

ImageJ (National Institute of Health, USA)

LabSpec 6 (Horiba Scientific, Frankreich)

Microsoft Excel 2016 (Microsoft Cooperation, USA)

OriginPro 2017G (OriginLab Cooperation, USA)

SpectralID 3.03 (Thermo Scientific, USA)

C ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<i>AcO</i>	Acetat
ADME	Akronym in der Pharmakokinetik für Absorption, Distribution, Metabolismus und Elimination
<i>Asc</i>	Ascorbinsäure
Asp	Asparaginsäure, saure, hydrophile Aminosäure
BIOMAG	IGSSE-Projekt " <i>Biomagnetic Interfaces for Non-Invasive Molecular Control</i> "
BXFM	Name für Olympus Mikroskope
CCD	Ladungsgekoppeltes elektronisches Bauteil der Kamera, engl. <i>charge coupled device</i>
CH <i>def.</i>	C-H-Deformationsschwingung
CH <i>str.</i>	C-H-Streckschwingung
Cys	Cystein, schwefelhaltige Aminosäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dps	DNA-bindendes Protein von hungrigen Zellen, engl. <i>DNA-binding proteins from starved cells</i>
EMCCD	Elektronen-Multiplikatork CCD, engl. <i>electron multiplying charge coupled device</i>
Eq-ApoFt	Apo ferritin aus der Pferd milz, engl. <i>equine spleen apo ferritin</i>
Eq-Ft	Ferritin aus der Pferd milz, engl. <i>equine spleen ferritin</i>
<i>Fh</i>	Ferrihydrit
<i>Ft</i>	Ferritin
FOC	Ferroxidasezentrum, engl. <i>ferroxidase center</i>
Glu	Glutaminsäure, saure, hydrophile Aminosäure
<i>Goe</i>	Goethit
HAADF-STEM	Rastertransmissionselektronenmikroskop mit annularen Dunkelfeld-Detektor, engl. <i>high-angle annular dark field scanning transmission electron microscopy</i>
<i>Häm</i>	Hämatit
HEK	Zelllinie, engl. <i>Human embryonic cells</i>

He-Ne	Helium-Neon
IBMI	Institute of Biological and Medical Imaging
ICP-MS	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma, engl. <i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
ICS	<i>internal intensity correction</i>
IGSSE	International Graduate School of Science and Engineering
IR	Infrarot
<i>Lac</i>	Lactat
<i>Lep</i>	Lepidokrokit
LWD	Objektiv mit langem Arbeitsabstand, engl. <i>long working distance</i>
<i>Mag</i>	Magnetit
<i>Magh</i>	Maghemit
MFt	Magnetoferitin
MRT	Magnetresonanztomografie
NA	Numerische Apertur
Nd:YAG	Neodym-dotiertes Yttrium-Aluminium-Granat-Laser
NIR	Nahes Infrarot
NP	Nanopartikel
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PDB	Proteindatenbank, engl. <i>protein data bank</i>
PEG	Polyethylenglykol
PEI	Polyethylenimin
Phe	Phenylalanin, aromatische Aminosäure
<i>Pyr</i>	Pyruvat
rApoFt	Rekombinant hergestelltes Apoferritin
RES	Retikuloendotheliales System
REM	Rasterelektronenmikroskop
RM	Raman-Mikrospektroskopie
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies, engl. <i>reactive oxygen species</i>
SEC	Gel-Permeations-Chromatographie, engl. <i>size exclusion chromatography</i>
TUM	Technische Universität München
Trp	Tryptophan, aromatische Aminosäure
Tyr	Tyrosin, aromatische Aminosäure

C ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

UV	Ultraviolett
XRD	Röntgenbeugung, engl. <i>X-ray diffractometry</i>