

**Photochemische und biochemische
Modifikation von Bakteriorhodopsin:
Optische Datenspeicherung und Hybridbio-Materialien**

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Dipl. Chem. Thorsten Fischer
aus Lemgo

Marburg/Lahn 2005

Vom Fachbereich Chemie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen am: 04.10.2005

Tag der mündlichen Prüfung: 20.10.2005

Erstgutachter: Prof. Dr. N. Hampp

Zweitgutachter: Prof. Dr. A. Greiner

V. I. T. R. I. O. L.

Einzelne Teile dieser Arbeit wurden vorab veröffentlicht:

1. N. Hampp, T. Fischer
Biomolecular optical storage.
Proc. IEEE-EMBS, (2002) 74-77.
2. N. Hampp, T. Fischer, M. Neebe
Bacteriorhodopsin-based photochromic pigments for optical security applications.
Proc. SPIE 4677, (2002) 121-128.
3. T. Fischer, M. Neebe, T. Juchem, N. Hampp
Biomolecular optical data storage and data encryption.
IEEE Transactions on NanoBiosciences, 2 (2003) 1-5.
4. T. Fischer, N. Hampp
Erforschung des Einsatzpotentials biomimetischer Verfahren zur Selbstassemblierung optoelektronischer Komponenten in der Mikrosystemtechnik am Beispiel von Purpormembran-Elektroden-Arrays. Teilprojekt: Modifizierung und Charakterisierung von Purpormembran zum Einsatz als biomolekulares Interface zwischen Nano- und Mikroskala.
Schlussbericht BMBF FKZ 16SV1637 (2004) 1-22.
5. T. Fischer, N. Hampp
Two-photon-absorption of bacteriorhodopsin: Formation of a red-shifted thermally stable photoproduct F 620.
Biophys. J., 89 (2005) 1175-1182.
6. B. Yao, M. Lei, L. Ren, N. Menke, Y. Wang, T. Fischer, N. Hampp
Polarization multiplexed WORM optical data storage in bacteriorhodopsin films.
Opt. Lett. submitted.

1	EINLEITUNG.....	1
2	BAKTÉRIORHODOPSIN	4
2.1	HALOBACTERIUM SALINARUM.....	4
2.2	PURPURMEMBRAN	5
2.3	BAKTÉRIORHODOPSIN.....	6
2.3.1	<i>Der Opsinshift von Bakteriorhodopsin.....</i>	<i>8</i>
2.4	DER PHOTOZYKLUS DES BAKTÉRIORHODOPSINS	9
3	MATERIAL UND METHODEN.....	12
3.1	VERWENDETE MATERIALIEN	12
3.1.1	<i>Bakteriorhodopsin.....</i>	<i>12</i>
3.1.2	<i>Bakterielle Transglutaminase.....</i>	<i>17</i>
3.1.3	<i>Chemikalien.....</i>	<i>17</i>
3.2	HERSTELLUNG VON BAKTÉRIORHODOPSIN-FILMEN UND -DRUCKEN.....	18
3.2.1	<i>Filmherstellung</i>	<i>18</i>
3.2.2	<i>Siebdruck.....</i>	<i>18</i>
3.2.3	<i>Tampondruck.....</i>	<i>19</i>
3.3	CHARAKTERISIERUNG VON DRUCKFARBEN UND DRUCKEN.....	19
3.3.1	<i>Kontaktwinkelmessungen</i>	<i>19</i>
3.3.2	<i>Rheologie</i>	<i>21</i>
3.3.3	<i>Farbmessungen</i>	<i>23</i>
3.3.4	<i>Photochromie.....</i>	<i>27</i>
3.3.5	<i>Lichteinheit.....</i>	<i>27</i>
3.4	HERSTELLUNG VON TSG-SUBSTRATEN.....	28
3.5	TRENNMETHODEN	29
3.5.1	<i>Zentrifugation.....</i>	<i>29</i>
3.5.2	<i>Dialyse</i>	<i>30</i>
3.5.3	<i>Filtration.....</i>	<i>30</i>
3.5.4	<i>HPLC</i>	<i>31</i>
3.6	SPEKTROSKOPISCHE UND SPEKTROMETRISCHE METHODEN.....	31
3.6.1	<i>UV/vis-Spektroskopie</i>	<i>31</i>
3.6.2	<i>Fluoreszenzspektroskopie.....</i>	<i>32</i>
3.6.3	<i>Photonenkorrelationsspektroskopie.....</i>	<i>33</i>
3.6.4	<i>Massenspektrometrie.....</i>	<i>34</i>
3.7	MIKROSKOPISCHE METHODEN	38
3.7.1	<i>Lichtmikroskopie.....</i>	<i>39</i>
3.7.2	<i>Elektronenmikroskopie.....</i>	<i>39</i>
3.7.3	<i>Rastersondenmikroskopie.....</i>	<i>41</i>
3.8	WEITERE METHODEN	41
3.8.1	<i>Kleinwinkelstreuung.....</i>	<i>41</i>
3.8.2	<i>Optische Aufbauten.....</i>	<i>42</i>
3.8.3	<i>Einengen und Trocknen von Proben</i>	<i>42</i>
3.8.4	<i>Einstellen der Feuchtigkeit von Drucken und Filmen.....</i>	<i>42</i>
3.8.5	<i>pH-Messung</i>	<i>42</i>
3.8.6	<i>Digitalphotographie.....</i>	<i>43</i>
4	CHARAKTERISIERUNG DER RELEVANTEN BR EIGENSCHAFTEN.....	44
4.1	INTERAKTION VON BR MIT MATRICES.....	44
4.1.1	<i>Lösungsmittelstabilität und Aggregation</i>	<i>44</i>
4.2	TEMPERATURSTABILITÄT	48
4.3	TEILCHENGRÖBENEINSTELLUNG	49
4.4	ZUSAMMENFASSUNG	56
5	BR ALS MULTIFUNKTIONALES SICHERHEITSELEMENT	57
5.1	EINLEITUNG.....	57
5.2	BR ALS PHOTOCHROMES SICHERHEITSELEMENT	58
5.2.1	<i>Einleitung.....</i>	<i>58</i>
5.2.2	<i>Entwicklung einer Tampondruckfarbe</i>	<i>60</i>
5.2.3	<i>Charakterisierung der Druckprodukte.....</i>	<i>70</i>
5.2.4	<i>Zusammenfassung.....</i>	<i>104</i>

5.3	BR ALS OPTISCHER DATENSPEICHER	105
5.3.1	Einleitung	105
5.3.2	Methoden der optischen Datenspeicherung	106
5.3.3	Charakterisierung der Photoprodukte	111
5.3.4	Charakterisierung und Optimierung der optischen Anisotropie	133
5.3.5	Anwendungen von BR als optischer Datenspeicher	141
5.3.6	Zusammenfassung	146
6	BR IN BIO-HYBRID- UND HYBRID-BIO-SYSTEMEN	148
6.1	EINLEITUNG	148
6.2	BR IN BIO-HYBRID-SYSTEMEN	148
6.2.1	Einleitung	148
6.2.2	Adaption von PM zum Einsatz als Nanobauteil	150
6.2.3	Evaluierung der Substrate	152
6.2.4	Verbindungsaufbau	156
6.2.5	Zusammenfassung	163
6.3	BR IN HYBRID-BIO-SYSTEMEN	164
6.3.1	Einleitung	164
6.3.2	Etablierung der massenspektrometrischen Analyse von BR	165
6.3.3	Auswahl und Evaluierung des Linker I	170
6.3.4	Auswahl und Evaluierung des Linker II	179
6.3.5	Assemblierung von Hybrid-Bio-Systemen	193
6.3.6	Zusammenfassung	196
7	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	198
7.1	BR ALS MULTIFUNKTIONALES SICHERHEITSELEMENT	198
7.2	BR IN BIO-HYBRID- UND HYBRID-BIO-SYSTEMEN	200
8	ANHANG	203
8.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	203
8.2	MASSENSPEKTREN	205
8.2.1	Fragment 7 des BrCN-Verdaus von Fmoc-OSu gelabelten D96N	205
8.2.2	Fragment 3 des BrCN-Verdaus von CPM gelabelten D36C	219
8.3	DANKSAGUNG	227
8.4	LITERATURSTELLEN	229

1 Einleitung

Kondratieff postulierte Mitte der zwanziger Jahre die Existenz von lang anhaltenden Konjunkturzyklen mit einer Zeitspanne von 40 bis 60 Jahren ^[1]. Diese, auch als lange Wellen der Konjunktur bezeichneten Kondratieffzyklen, beschreiben den Anstieg und Abstieg volkswirtschaftlicher Entwicklung. Als Träger dieser Wellen liegt jeweils eine Basisinnovation zugrunde. Als Basisinnovationen werden bahnbrechende Erfindungen oder Neuerungen bezeichnet die eine die Gesellschaft durchdringende Wirkung zeigen, wie z.B. die Dampfmaschine (Beginn der industriellen Revolution), oder die Computer- und Informationstechnologie.

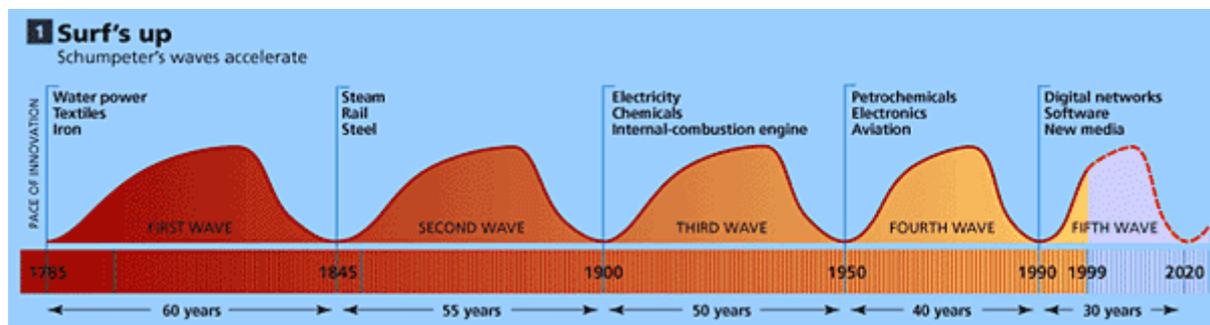


Abb. 1: Darstellung der 5 Kondratieffzyklen mit den zugehörigen Basisinnovationen ^[2].

Für das 21. Jahrhundert zeichnet sich bereits der 6. Kondratieffzyklus ab. Die Hauptträger dieser neuen Welle stellen die schnell wachsenden Bereiche Biotechnologie und Nanotechnologie dar. Die industriellen Wachstumsraten pro Jahr liegen für diese Basisinnovationen bei 25 % bzw. 50 %. Es betätigen sich bereits über 4000 Unternehmen weltweit in den Bereichen Bio- und Nanotechnologie ^[3]. Worin liegt das innovative Potential dieser Schlüsseltechnologien?

Die Biotechnologie stellt die technische Anwendung von Forschungsergebnissen der Biowissenschaften dar. Durch Transfer von biologischen Systemen in technische Anwendungen kann der sehr hohe Effizienzgrad dieser Systeme, der durch evolutionäre Optimierung von der Natur in Jahrtausenden erreicht wurde, nutzbar gemacht werden. Mit Hilfe von gentechnologischen und biochemischen Methoden besteht weiterhin die Möglichkeit die Materialien, bei Kenntnis der molekularen Funktionsweise, gezielt auf eine Anwendung hin zu optimieren.

Die Nanotechnologie beruht auf der Verwendung von nanoskaligen Bauelementen. Materie im Nanobereich zeigt aufgrund der Annäherung an die Dimensionen von Molekülen und Atomen ein mesoskopisches Verhalten. Es handelt sich somit um physikalische Systeme die weder makroskopisch im Rahmen der klassischen Physik, noch mikroskopisch, d.h. elementar quantenmechanisch, beschrieben werden können ^[4-6]. Materie im Nanobereich verfügt deshalb über ungewöhnliche und neuartige Eigenschaften und erschließt somit ein riesiges Feld von Innovationsmöglichkeiten.

Die gemeinsame Schnittmenge der Bereiche Nano- und Biotechnologie wird als Nanobiotechnologie bezeichnet. In diesem Teilbereich werden Synergieeffekte genutzt, die sich durch Kombination der beiden Technologien ergeben.

Die vorliegende Arbeit widmet sich der Applikation des Membranprotein Bakteriorhodopsin als nanobiologisches Material. Es gilt als das am besten charakterisierte Membranprotein ^[7], mit exakt definierten physikalischen und chemischen Eigenschaften. Weiterhin zeigt es eine für biologische Systeme bemerkenswerte Stabilität und Toleranz gegenüber Umwelteinflüssen und ist somit sehr gut geeignet zur Integration in technische Applikationen ^[8].

Tab. 1: Denkbare technische Anwendungen von Bakteriorhodopsin ^[8, 9].

Ladungstransport	<ul style="list-style-type: none"> • Meerwasserentsalzung • Solarzellen
Photochrom	<ul style="list-style-type: none"> • 2-D und 3-D Datenspeicher • Holographische Datenspeicher • Optische Schalter • Signalbearbeitung • Mustererkennung • Photochromes Pigment in Sicherheitsdruckfarben
Photoelektrisch	<ul style="list-style-type: none"> • Ultraschnelle Lichtdetektion • Bewegungsdetektoren
Verschiedenes	<ul style="list-style-type: none"> • Frequenzverdoppler • Biosensoren

Tab. 1 zeigt nur einen Ausschnitt der Anwendungen die für Bakteriorhodopsin denkbar sind. Aufgrund des photochromen Verhaltens ist Bakteriorhodopsin besonders für den Einsatz in optischen Anwendungen prädestiniert ^[8]. Andere Anwendungsbeispiele beruhen auf einem Protonentransport durch die Membran, der an den Photozyklus des Bakteriorhodopsin gekoppelt ist und als Motor der Photosynthese des Organismus fungiert.

Die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Hampp befasst sich verstärkt mit dem Einsatz des Bakteriorhodopsins in technischen Anwendungen. Die thematische Hauptausrichtung lag und liegt bei der Verwendung von Bakteriorhodopsin im Bereich der Sicherheitstechnik und der optischen Datenspeicherung ^[10]. Im Rahmen dieser Arbeit sollen die Konzepte von Bakteriorhodopsin als photochromes Pigment und als optischer Langzeitdatenspeicher stark erweitert werden und zu einem multifunktionalen Sicherheitskonzept auf Basis von Bakteriorhodopsin vereint werden.

Ein weiteres wachstumsstarkes Feld der Nanotechnologie liegt in der modularen Integration von biologischen und mikroelektronischen Systemen. Durch die bisher gewonnenen Erfahrungen aus der Biosensorentwicklung und Mikrosystemtechnik ergeben sich in Kombination hohe synergetische Effekte für diese so genannten Biohybrid-Systeme. Ein methodisch ähnliches Arbeitsgebiet zu den Biohybrid-Systemen wird im Rahmen der 2003 an der Philipps-Universität Marburg eingerichteten DFG-Forschergruppe "Chemisch-biologische Hybridsysteme" in der Arbeitsgruppe bearbeitet. Ziel dieses im Aufbau befindlichen Forschungsschwerpunkts ist die Synthese von neuen Hybridbio-Materialien, die sowohl chemische als auch biologische Komponenten enthalten und deren technische Applikation. Im Rahmen dieser Arbeit sollen Grundlagen und Konzepte für die Verwendung von Bakteriorhodopsin in Biohybrid- und Hybridbio-Systemen aufgezeigt werden.

2 Bakteriorhodopsin

2.1 *Halobacterium salinarum*

Die Gruppe der Archaeen, zu der das *Halobacterium salinarum* gehört, bildet gemeinsam mit den Eukaryonten und den Bakterien die drei Domänen der Lebewesen ^[11]. Archaeen sind einzellige Organismen mit einem meist ringförmigen Chromosom in einem Nucleoid, die weder ein Cytoskelett noch Zellorganellen enthalten, sich aber von den Bakterien durch fehlendes Peptidoglycan in der Zellmembran und eine andere Struktur ihrer Ribosomen unterscheiden ^[12].

Die Archaeen werden in die Abteilungen der Crenarchaeota, Korarchaeota und der Euryarchaeota unterteilt. Neuerdings wird die Bildung einer vierten Abteilung vorgeschlagen, die der Nanoarchaeota mit dem einzigen bekannten Vertreter *Nanoarchaeum equitans* ^[12].

Zur Abteilung der Euryarchaeota gehört unter anderen die Klasse der halophilen Archaeen. Der Lebensraum der halophilen Archaeen sind salzreiche Gewässer (optimale Kochsalzkonzentration 4.3 M), wie z.B. Salzseen oder Salinen ^[13]. Allen halophilen Archaeen, momentan sind sechs verschiedene Gruppen bekannt ^[14], ist gemein, dass sie Retinalproteine zur Photosynthese enthalten.

Das Retinalprotein Bakteriorhodopsin (BR) ist ein integraler Bestandteil der Membran des *Halobacterium salinarum* ^[15]. Der Stoffwechsel dieses Archae erfolgt, bei ausreichender Sauerstoffkonzentration der Umgebung, durch oxidativen Metabolismus. Nimmt der Sauerstoffgehalt ab, erfolgt die vermehrte Synthese und Einlagerung von Bakteriorhodopsin in die Membran. Es kommt zur Ausbildung der Purpurmembran (PM), wobei bis zu 80 % der Zelloberfläche des *Halobacterium salinarum* aus Purpurmembran bestehen können. Das Bakteriorhodopsin in der Membran fungiert als lichtgetriebene Protonenpumpe. Der dabei entstehende Protonengradient, der über die Zellmembran generiert wird, dient der membrangebundenen ATPase zur ATP-Synthese ^[15]. Somit kann der Stoffwechsel des *Halobacterium salinarum* auch unter sauerstoffarmen Bedingungen aufrechterhalten werden.

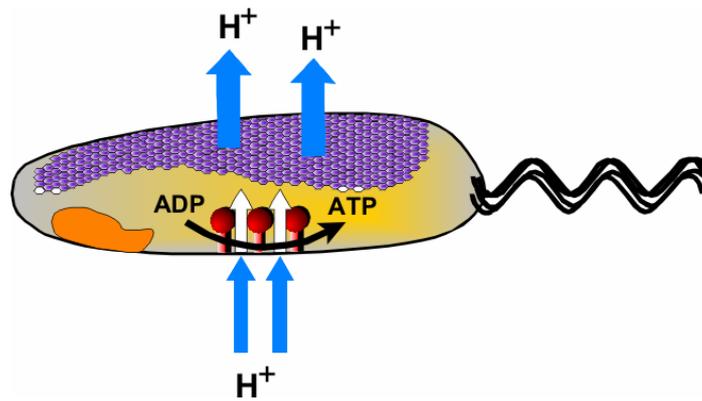


Abb. 2: Schematische Darstellung einer Zelle von *Halobacterium salinarum*.

Als weitere lichtgetriggerte Proteine enthält das *Halobacterium salinarum* das Halorhodopsin (HR), eine Chloridpumpe ^[16, 17], die zum Erhalt isoosmolarer Bedingungen im Cytoplasma beiträgt und die Sensorrhodopsine (SRI/SRII) ^[18, 19], die es der Zelle ermöglichen schädliches blaues und UV-Licht zu erkennen und somit Lebensbereiche mit starker Präsenz dieser Strahlung zu meiden ^[20].

2.2 Purpurmembran

Als Purpurmembran bezeichnet man die Bereiche in der Zellmembran von *Halobacterium salinarum* in die Bakteriorhodopsin eingelagert wurde. Sie besteht zu 25 % (w/w) aus Lipiden und zu 75 % (w/w) aus Bakteriorhodopsin. Die Einlagerung des Bakteriorhodopsin erfolgt in Form eines zweidimensionalen hexagonalen Gitters (P3), wobei sich jeweils drei Proteine zu einem Trimer zusammenlagern. Die Orientierung der Bakteriorhodopsinmoleküle ist hierbei so, dass sich der Carboxyterminus auf der cytoplasmatischen Seite und der Aminoterminus auf der extrazellulären Seite befindet ^[21-23].

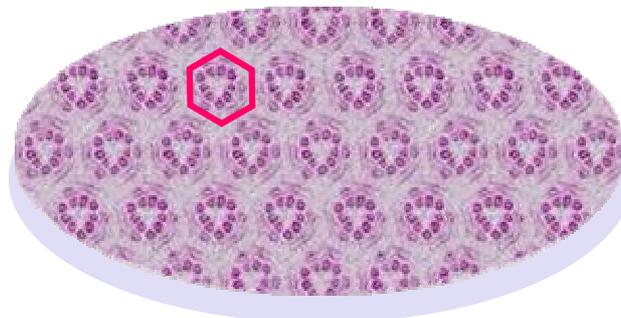


Abb. 3: Schematische Darstellung der Purpurmembran aus Daten verschiedener Beugungsexperimente.

Durch die Ausbildung dieses Kristallgitters aus Protein und umgebenden Lipidmolekülen wird die Membran stabilisiert. Dieser Aufbau wird ursächlich durch einige Aminosäureseitenketten des Proteins hervorgerufen, die wie ein Anker einzelne Glycerinether umklammern ^[24]. Deshalb besitzt Bakteriorhodopsin, in membranintegrierter Form, im Vergleich zu anderen Proteinen eine ungewöhnliche Stabilität und ist weitgehend tolerant gegenüber chemischen und physikalischen Einflüssen, wie Temperatur, Solvens, Salzkonzentration und pH-Wert. Wird dieser kristalline Verband allerdings aufgelöst, verliert das Bakteriorhodopsin seine hohe Stabilität gegenüber seiner Umgebung. Weitere Eigenschaften der Purpormembran sind in Tab. 2 dargestellt:

Tab. 2: Eigenschaften der Purpormembran ^[25-27].

Dimension	<ul style="list-style-type: none"> • Dicke 5 nm, Durchmesser bis 1 μm
Aufbau/Struktur	<ul style="list-style-type: none"> • 2-dimensionaler hexagonaler Kristall aus BR-Trimeren in einer Lipiddoppelschicht • Gitterabstand der Trimere 6.2 nm • Verhältnis Lipid:Protein 10:1 (n/n), 1:3 (m/m)

Grundlegende Voraussetzung für die in der Einleitung genannten technischen Verwendungen ist, neben der zuvor diskutierten Stabilität des Proteins, die Verfügbarkeit im isolierten Zustand. Durch biotechnologische Prozesse kann Bakteriorhodopsin in Form von Zellmembranfragmenten unter geringem Aufwand aus *Halobacterium salinarum* isoliert werden ^[28].

2.3 Bakteriorhodopsin

Das Proteingerüst von Bakteriorhodopsin besteht aus 248 Aminosäuren mit überwiegend hydrophoben Seitenketten. Die Struktur, die sich bei der Membranintegration ausbildet, verfügt über sieben transmembrane α -Helices (A bis G). Für die Strukturausbildung zeichnen sich hydrophobe Wechselwirkungen verantwortlich, mangels Cystein kommt es nicht zur Ausbildung von Schwefelbrücken. Die Helices sind ringförmig und annähernd parallel angeordnet, stehen senkrecht zur Membran und bilden in der Mitte eine Protonenpore. Lediglich die Termini und die Schleifen, die die Helices verbinden, ragen aufgrund ihres hydrophilen Charakters aus der Lipidschicht heraus ^[29-31].

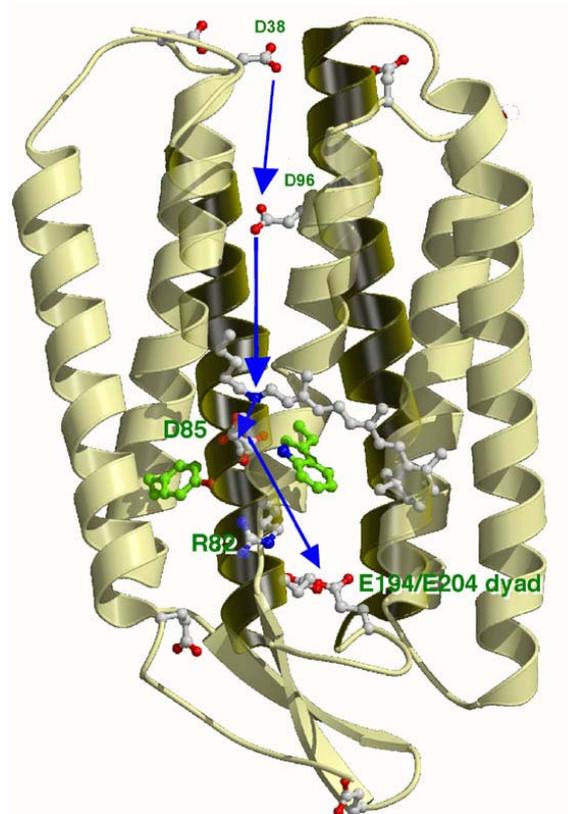


Abb. 4: Modell des Protonentransportes durch das Bakteriorhodopsin.

Innerhalb der Protonenpore des Transmembranproteins befindet sich das als Imin (Schiffsche Base) an die ϵ -Aminogruppe des Lysin-216 gebundene prosthetische Retinal. Beim Membranaufbau wird zunächst das retinalfreie Apoprotein Bakterioropsin (BO) in die Membran eingelagert und kristallisiert dort erst nach der Reaktion mit dem Retinal aus.

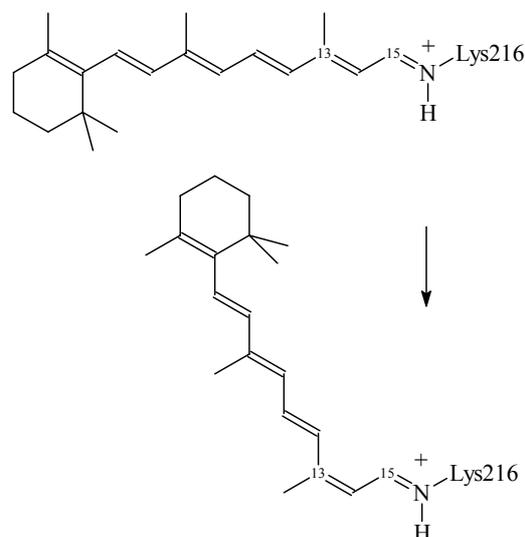


Abb. 5: Retinal als chromophore Gruppe im BR. Oben: all-*trans*-Retinal. Unten: 13-*cis* Retinal.

Das Retinal trennt die Pore in eine cytoplasmatische und eine extrazelluläre Halbpore und wirkt durch seinen photosensitiven Charakter als lichtgetriebener Schalter zwischen den beiden Halbporen. Das π -Elektronensystem des Chromophors Retinal reagiert, unter Einstrahlung eines Photons geeigneter Wellenlänge, mit einer reversiblen Photoisomerisierung. Die Lage des Retinals innerhalb des Proteins wird durch drei Tryptophanreste stabilisiert, weiterhin dienen die Reste des Asparat-85 und Asparat-212 als Gegenion für die positive Ladung des Imins.

Tab. 3: Eigenschaften von Bakteriorhodopsin ^[6, 15, 32].

Aufbau/Struktur	<ul style="list-style-type: none"> • Primärstruktur: 248 Aminosäuren + Chromophor Retinal • Sekundärstruktur: 7 α-Helices • Molekulargewicht: 26784 Dalton
Chromophor	<ul style="list-style-type: none"> • Retinal an Lysin-216 gebunden • Molekulargewicht: 280 Dalton • Extinktion: $\epsilon_{568} = 63,000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ & $\epsilon_{410} = 45,000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
Funktion	<ul style="list-style-type: none"> • Lichtgetriebene Protonenpumpe
Stabilität (membranintegriert)	<ul style="list-style-type: none"> • Bei Sauerstoffanwesenheit und Belichtung • Bei Temperaturen bis 80 °C • Bei pH-Werten zwischen pH 0 und pH 12

2.3.1 Der Opsinshift von Bakteriorhodopsin

Das Maximum der Absorption von all-*trans*-Retinal in n-Hexan findet sich bei $\lambda = 370 \text{ nm}$. Ist das Retinal in die Proteinmatrix von Bakteriorhodopsin integriert, liegt das Absorptionsmaximum bathochrom verschoben bei $\lambda = 570 \text{ nm}$. Für diesen als Opsinshift bezeichneten Effekt werden mehrere Faktoren postuliert ^[33]:

1. Aufgrund der räumlichen Position und geringen Bewegungsfreiheit des Retinals innerhalb des Proteingerüsts wird der Cyclohexenring in einer 6-*s-trans* Konformation fixiert. Dies ermöglicht, im Gegensatz zum freien Retinalchromophor, die vollständige Delokalisation der Elektronen.
2. Durch die positive Ladung am Stickstoff der Schiffischen Base wird ein bathochromer Shift erzeugt.

3. Die positive Ladung am Stickstoff der Schiffsbasis und somit der bathochrome Shift wird durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem Chromophor und geladenen Aminosäuren, wie z.B. Aspartat-85, vermindert.

Diese elektrostatischen Wechselwirkungen werden durch Wassermoleküle zwischen den Ladungsträgern abgeschwächt. Somit tragen sie zu einer Vergrößerung des bathochromen Shifts bei. Werden allerdings Wassermoleküle aus der Protonenpore entfernt, nimmt die Stärke des Opsinshifts ab ^[34].

2.4 Der Photozyklus des Bakteriorhodopsins

An den für den Stoffwechsel nötigen Protonentransport ist ein komplexer Photozyklus gebunden. Das allgemein akzeptierte Modell für diesen Zyklus ist in Abb. 6 dargestellt ^[35].

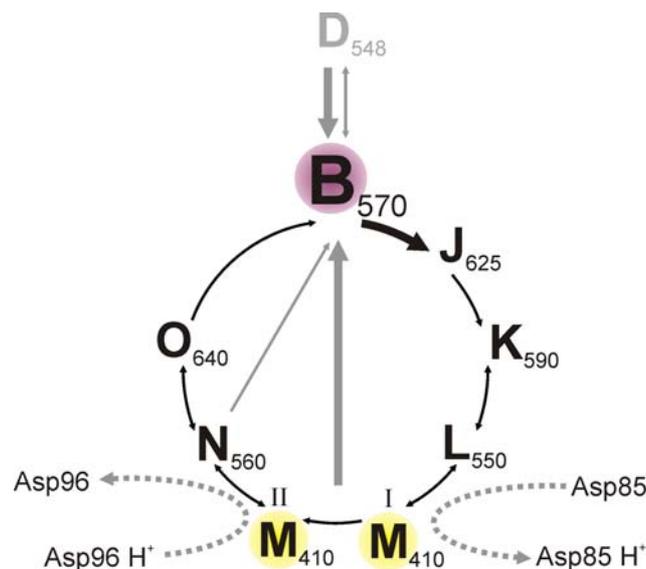


Abb. 6: *trans*-Photozyklus des BR. Die Intermediate sind mit Großbuchstaben bezeichnet, deren Index das jeweilige Absorptionsmaximum angibt. Dicke Pfeile stehen für photochemische, dünne Pfeile für thermische Übergänge.

Wurde die Probe vor der Belichtung für längere Zeit in Dunkelheit aufbewahrt, liegt das Retinal im Bakteriorhodopsin in einer Mischung von *all-trans* (B_{570}) und *13-cis* (D_{548}) vor ^[36, 37]. Dieser Zustand wird als dunkeladaptiert bezeichnet. Das Gleichgewichtsverhältnis der beiden Konfigurationen hängt von verschiedenen Faktoren, wie z.B. Temperatur und pH-Wert, ab. Sowohl B_{570} als auch D_{548} verfügen über einen eigenen Photozyklus. Der für die ATP-Synthese wichtige Protonentransport ist allerdings ausschließlich an den Photozyklus

des B₅₇₀ Zustandes gebunden. Nach einer Breitbandbelichtung liegt Bakteriorhodopsin zu > 98 % in der B₅₇₀ Konfiguration vor ^[38]. In diesem lichtadaptierten Zustand kann der Photozyklus des D₅₄₈ weitgehend vernachlässigt werden.

Nach Absorption eines Photons erfolgt ein Übergang von B₅₇₀ in einen elektronisch angeregten Zustand B*, der dann über das Intermediat I₄₆₀ zu dem Intermediat J₆₂₅ relaxiert. J₆₂₅ ist bereits durch eine 13-*cis*-Konfiguration des Retinals gekennzeichnet. Die Lichtabsorption bewirkt also eine Photoisomerisierung des an Lysin-216 gebundenen photosensitiven Retinals von all-*trans* nach 13-*cis*-15-*anti*. Dieser Vorgang findet auf einer Zeitskala von ca. 0.5 ps nach Absorption des Photons statt und die Quanteneffizienz liegt bei 64 %. Danach erfolgt innerhalb von ca. 5 ps eine thermische Relaxation zum Intermediat K₅₉₀. Von K₅₉₀ aus wird innerhalb von ca. 1 µs L₅₅₀ gebildet. In diesen beiden Schritten treten, als Folge der Isomerisierung des Retinals, kleinere räumliche Veränderungen im Protein auf. Diese räumliche Veränderung und die Isomerisierung gehen mit einer Verschiebung der Schiffischen Base einher, so dass nun im weiteren Verlauf eine Abgabe des Protons am Stickstoff der Schiffischen Base an Aspartat-85 erfolgen kann. Dieser Protonentransfer findet innerhalb von 50 µs statt und das hiernach gebildete Intermediat wird als M^I₄₁₀ oder auch als „early M“ bezeichnet. Die Protonierung zur Asparaginsäure-85 führt zu einer gleichzeitigen Deprotonierung des benachbarten Protonreleasecomplex (PRC), zu dem Arginin-82, Glutamin-204 und Glutamin-194 gehören, an das extrazelluläre Medium. Das Intermediat M^I₄₁₀ ist durch die Deprotonierung des Imins am Chromophor mit einer stark hypsochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums verbunden. Darauf erfolgt ein irreversibler Übergang zu dem postulierten, spektroskopisch nicht unterscheidbaren Intermediat M^{II}₄₁₀ / „late M“ ^[39]. Dieser Übergang ist durch das Ausschwingen der Helix F gekennzeichnet, was zu einer Verengung des Protonenkanals in Richtung der extrazellulären Seite und Aufweitung in Richtung der cytoplasmatischen Seite führt ^[40]. Dieser Schritt, der auch als „large conformational change“ bezeichnet wird, führt zu einer Änderung in der Zugänglichkeit der Schiffischen Base. Im Verlauf von M^{II}₄₁₀ zu N₅₆₀ wird die Schiffische Base durch die Asparaginsäure-96 reprotoniert. Dieser Schritt findet bei neutralem pH des umgebenden Mediums innerhalb weniger Millisekunden statt. Beim Übergang von N₅₆₀ zu O₆₄₀ erfolgt die Reisomerisierung des Retinals von der 13-*cis*- in die all-*trans*-Konfiguration und die Reprotonierung des Aspartat-96 von der cytoplasmatischen Seite ^[41]. Infolge dessen relaxieren auch die Helices und der Protonenkanal öffnet sich wieder zur extrazellulären Seite. Im letzten Schritt zum Ausgangszustand B₅₇₀ gibt Asparaginsäure-85 ein Proton an den

Protonreleasecomplex ab. Damit endet der Photozyklus und das System kann erneut photochemisch angeregt werden.

Durch De- und Reprotonierung ergibt sich somit ein Protonentransport von der cytoplasmatischen (CP) zur extrazellulären (EC) Seite.

Tab. 4: Übersicht der ablaufenden Prozesse im Photozyklus. Die Protonabgabe & -aufnahme wurde auf das Medium bezogen.

	B	J	K	L	M1	M2	N	O	B
Retinal	all- <i>trans</i>	13- <i>cis</i>						all- <i>trans</i>	
Prozess			therm. Relaxation	Protein-konformation		Protein-konformation		Protein-konformation	
CP-Medium								Protonabgabe	
Asp96	protoniert						deprot.	protoniert	
Schiff. Base	protoniert			deprotoniert		protoniert			
Asp85	deprotoniert			protoniert				deprot.	
PRC	protoniert			deprotoniert				prot.	
EC-Medium								Protonaufnahme	

Neben der thermischen Relaxation des M_{410} Intermediats zum Zustand B_{570} , ist es auch möglich durch Einstrahlung in die Absorptionsbande bei $\lambda = 410$ nm photochemisch zum Ausgangszustand B_{570} zurückzukehren. Dieser Übergang erfolgt nicht direkt, sondern innerhalb von ca. 10 ns über mehrere thermische Intermediate ^[42]. Die Quanteneffizienz liegt für diesen Schritt mit ca. 60 % auf dem Niveau der Hinreaktion.

Der direkte thermische Übergang von N_{560} nach B_{570} wird beim Wildtyp des Bakteriorhodopsins unter pH 9 nicht beobachtet ^[43]. Er findet bei der in dieser Arbeit u.a. verwendeten Mutante D96N statt, die durch gentechnischen Austausch der Asparaginsäure an Position 96 gegen Asparagin erzeugt wird. Da der Protonendonator Asparaginsäure fehlt, kann kein O_{640} Zustand gebildet werden und die Reprotonierung somit nur direkt von der cytoplasmatischen Seite erfolgen, was mit einer Verlängerung der Lebensdauer des Intermediats M einhergeht (siehe Kapitel 5.2.1.1) ^[44].

3 Material und Methoden

3.1 *Verwendete Materialien*

3.1.1 Bakteriorhodopsin

Das in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Bakteriorhodopsin wurde zumeist als membranintegriertes Protein, also in Form der Purpurmembran, verwendet. Im Folgenden wird aber einfach nur von Bakteriorhodopsin gesprochen. Falls monomerisiertes Bakteriorhodopsin verwendet wurde, wird dies ausdrücklich im Text erwähnt.

3.1.1.1 Herstellung

Bakteriorhodopsin Wildtyp aus *Halobacterium salinarum* und sämtliche gentechnische Mutanten wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Oesterhelt (MPI für Biochemie, Martinsried), sowie von der Firma MIB (Marburg) nach Standardprozeduren ^[28] hergestellt und in Form von wässrigen Suspensionen zur Verfügung gestellt.

3.1.1.2 Aufreinigung und Reinheitsgrade

Zur Isolation der Purpurmembranfragmente aus dem *Halobacterium salinarum*, wird nach osmotischem Schock, die Zellmasse zunächst mit Desoxyribonuclease behandelt und durch Dialyse und Zentrifugation in ihre Bestandteile zerlegt. Das hierbei gewonnene Material wird als **PM crude** bezeichnet und enthält neben der Purpurmembran unter anderem die so genannte rote Membran, welche durch Einlagerung von Carotinoiden in die Membran charakterisiert ist ^[45]. Dieser Typ PM verfügt aufgrund der nicht photochromen roten Membran über einen verminderten Gamut im Farbraum und ist deshalb nicht für die Anwendung als Farbpigment geeignet.

Durch weitere Aufreinigung mittels Dichtegradientenzentrifugation (vgl. Kapitel 3.5.1.2) kann so genannte **PM rein** gewonnen werden, die frei von störender roter Membran ist.

Durch Optimierung der Bedingungen gelang es die Entstehung der roten Membran während der Zucht zu minimieren. Dieser weitgehend von roter Membran freie PM Typ wird als **PM technisch** bezeichnet und muss nicht durch die zeitintensive Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Purpurmembran war vom Typ **PM rein**, sofern nicht anders vermerkt.

3.1.1.3 Homogenisierung

Durch unterschiedliche Zucht- und Aufarbeitungsbedingungen ergibt sich eine große Varianz in den Purpurmembranfragmentgrößen. Die Teilchengrößen liegen zwischen 100 nm und 1 µm bei polymodaler Verteilung. Zur Integration von Bakteriorhodopsin in bestehende Prozesse bzw. zur Entwicklung neuer Applikation, muss gewährleistet werden, dass das Material mit immer gleichen und exakt definierten physikalischen und chemischen Eigenschaften vorliegt. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Verfahren zur Homogenisierung und Teilchengrößeneinstellung von Purpurmembran entwickelt (siehe Kapitel 4.3).

Im Rahmen der Entwicklung wurden zwei unterschiedliche Techniken evaluiert. Homogenisierung und Teilchengrößeneinstellung mittels Ultraschall mit einer Ultraschallsonde vom Typ Sonifier W-450D (Branson, Danbury, USA) und einem Ultraschallbad vom Typ Sonorex Super RK 106 (Bandelin, Berlin) und Homogenisierung mittels Hochdruckhomogenisation mit Apparaturen vom Typ French Pressure Cell Press (Thermo, Dreieich) und Micron Lab40 (APV-Gaulin, Lübeck).

Als Standardmethode wurde die Homogenisierung mit der Ultraschallsonde (1 s Schallintervall, 5 s Pausenintervall, 25 % Amplitude (Microtip), 1 min Gesamtschallzeit) im Eisbad durchgeführt. Es wurden konsekutive Ultraschallbehandlungen nach der Standardmethode durchgeführt, bis der gewünschte Grad der Homogenisation erreicht war.

3.1.1.4 Lagerung und Verwendungsformen

Purpurmembran in Suspension wurde zur Langzeitlagerung bei –20 °C im Gefrierschrank gelagert. Suspensionen geringer OD können und wurden bis zu einer Woche bei 6 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Purpurmembran als trockener Feststoff wurde durch Gefriertrocknung erzeugt.

Zur Gefriertrocknung wurden zwei Verfahren eingesetzt:

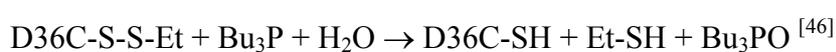
1. Geringe Mengen Suspension wurden nach Filtration durch einen 5 µm Nylon-Spritzenfilter vom Typ Cameo 30N (Osmonics, Minnetonka, USA) in einem Injektionsfläschchen zunächst bei -20 °C in einer Gefriertrocknungsanlage vom Typ Alpha 2-4 (Christ, Osterode am Harz) tiefgefroren und die flüchtige Phase bei 5 °C unter vermindertem Druck absublimiert. Nach Beendigung der Gefriertrocknung wurden die Injektionsflaschen vakuumverschlossen.
2. Größere Mengen Suspension wurden nach Filtration durch einen 5 µm Nylon-Spritzenfilter vom Typ Cameo 30N (Osmonics, Minnetonka, USA) in einem Rundkolben unter Umschwenken in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und die flüchtige Phase unter vermindertem Druck an einer Gefriertrocknungsanlage vom Typ Alpha 2-4 (Christ, Osterode am Harz) absublimiert.

3.1.1.5 Lagerung und Verwendung der Mutante D36C

Die Lagerung der Mutante D36C erfolgte bei -20 °C unter Zusatz eines mindestens fünfzigfachen molaren Überschusses an 2-Mercaptoethanol. Eine Lagerung ohne Mercaptoethanol als Schutzreagenz würde zu einer irreversiblen Autooxidation des Thiols der Cysteingruppe führen.

Teilweise zeigten die Proben nach dem Auftauen Aggregate, die mit Hilfe einer Ultraschallsonde zerkleinert werden konnten (siehe Kapitel 3.1.1.3).

Die Reduktion disulfidischer Schutzbrücken, die durch Reaktion von Mercaptoethanol mit D36C an Luftsauerstoff gebildet werden, wurde durch Einsatz von Tributylphosphin erreicht. Prinzipiell kann dieses Reagenz in situ eingesetzt werden, da neben der zu reduzierenden Verbindung kein freies Thiol anwesend ist:



Da allerdings Mercaptoethanol ein Reaktionsprodukt der Entschützungsreaktion darstellt und es zusätzlich im Überschuss in der Suspension vorliegt (siehe oben), kann es je nach

nachfolgender Reaktion sinnvoll sein, das Mercaptoethanol vor und nach dem Entschützen durch Sedimentationszentrifugation zu entfernen. Dies wurde in dieser Arbeit für die unterschiedlichen Reaktionen berücksichtigt.

Die Reduktion erfolgte im jeweiligen Reaktionsansatz bzw. bei späterer Abtrennung des Mercaptoethanols in Phosphatpuffer (10 mM, pH 7.2, EDTA 1 mM) durch Zugabe von 1 μ L einer 1 %-igen (v/v) PBU₃-Lösung in Propanol (jeweils frisch angesetzt) für 10 nmol BR und Inkubation für 30 min bei 37 °C^[47].

Um die Autooxidation durch katalytisch wirkende Schwermetallionen zu verlangsamen, kann in den Ansätzen für nachfolgende Reaktionen 1 mM EDTA zugesetzt werden. Dies wurde, wenn sinnvoll, in dieser Arbeit für die unterschiedlichen Reaktionen berücksichtigt.

Jede D36C Charge wurde vor ihrer Verwendung auf ihre Aktivität bezüglich reaktiver Thiolgruppen getestet, hierzu wurde zunächst entschützt und dann eine Fluoreszenzmarkierung an der Thiolgruppe durchgeführt. Das verwendete 7-Diethylamino-3-(4'-maleinimidylphenyl)-4-methylcoumarin (CPM) zeichnet sich durch eine schwache Fluoreszenz aus, die durch Bindung eines Thiols an die Maleinimidylgruppe des CPM drastisch verstärkt wird. Somit kann die Fluoreszenz von CPM als Indikator für reaktive Thiolgruppen verwendet werden, ohne dass überschüssiges CPM vor der Messung entfernt werden müsste^[47].

Zur CPM Markierung wurde 1 nmol entschütztes D36C, 1 nmol D96N (0 % Referenz) und 1 nmol D96N + 1 nmol Cystein (100 % Referenz) in je 900 μ L Phosphatpuffer (10 mM, pH 7.2, EDTA 1 mM) mit je 100 μ L CPM Arbeitslösung versetzt, kurz gevortext und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Dann wurde mit 9 mL Phosphatpuffer (10 mM, pH 8.5, EDTA 1 mM) verdünnt und für weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert^[47].

CPM Stammlösung 2 mg CPM
 100 μ L DMF

CPM Arbeitslösung 10 μ L CPM Stammlösung
 ad Phosphatpuffer (10 mM, pH 7.2, EDTA 1 mM)

Die Fluoreszenzmessung der Proben erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda = 387$ nm. Das Fluoreszenzmaximum liegt bei $\lambda = 474$ nm. Der Gehalt an aktiven Thiolgruppe einer D36C Charge errechnet sich, bezogen auf die beiden Referenzen, wie folgt (siehe Abb. 7):

$$\text{Aktivität}_{D36C} = \frac{FI_{D36C} - FI_{D96N}}{FI_{D96N+Cystein} - FI_{D96N}} \cdot 100 \% \quad (1)$$

mit	Aktivität_{D36C}	aktive Thiolgruppen D36C
	FI_{D36C}	Fluoreszenzintensität der D36C Probe
	FI_{D96N}	Fluoreszenzintensität der D96N Probe
	$FI_{D96N+Cystein}$	Fluoreszenzintensität der D96N + Cystein Probe

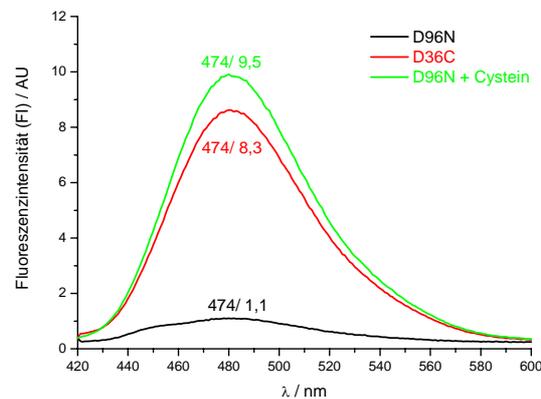


Abb. 7: Fluoreszenzspektren einer Aktivitätsbestimmung von D36C mittels CPM.

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten D36C Chargen wiesen eine Aktivität von $\gg 40$ % auf. Bei ca. 18,000 BR Einheiten pro PM Fragment ergeben sich $\gg 7,200$ aktive Thiolbindungsstellen, somit ist eine mehr als ausreichende Reaktivität der PM gewährleistet.

3.1.1.6 Lichtadaption

Falls nicht anders erwähnt, wurden alle PM-haltigen Filme, Drucke und Suspensionen vor den Messungen lichtadaptiert. Die Lichtadaption der Suspensionen erfolgte mit Hilfe eines Diaprojektors mit einer 150 W Halogenlampe. Hierbei wurde durch ein Wasserbad eine Erwärmung der Probe verhindert. Zur Lichtadaption der Filme und Drucke wurde eine 100 W Glühlampe eingesetzt.

3.1.2 Bakterielle Transglutaminase

Bakterielle Transglutaminase (TGase) aus *Streptovercillium mobaraense* wurde von der Arbeitsgruppe Prof. Fuchsbaauer (FH Darmstadt) zur Verfügung gestellt.

Zum Nachweis der enzymatischen Aktivität der verwendeten TGase wurde 1-N-(carbobenzoxo-L-glutaminylglycyl)-5-N-(5'-N',N'-dimethylamino-1'-naphtalensulfonyl)di-amidopentan (CBZ-Gln-Gly-C-DNS) mit 5-N-(5'-N'-N'-Dimethyl-amino-1'-naphtalensulfonyl)di-amidopentan (Dansylcadaverin, C-DNS) umgesetzt. CBZ-Gln-Gly-C-DNS ist ein modifiziertes, fluoreszierendes Dipeptid von Glutamin und Glycin und stellt ein TGase-Substrat dar^[48]. C-DNS ist ein Fluoreszenzmarker, dessen Aminopentanrest strukturell der ϵ -Aminogruppe des Lysins ähnlich ist und als Substrat für die TGase geeignet ist^[49,50].

Hierzu wurden 1 μ L CBZ-Gln-Gly-C-DNS (10 mM in DMSO), 1 μ L C-DNS (10 mM in DMSO) & 10 μ L TGase (1 U / 100 μ L) mit 100 μ L Trispuffer (30 mM, pH 7.2) versetzt und gevortext. Die Suspension wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Der Nachweis der Enzymaktivität galt als erbracht, wenn bei einer Dünnschichtchromatographie (TLC) neben den Edukten das Produkt mittels Fluoreszenz nachgewiesen werden konnte.

Die Transglutaminase wurde als Suspension bei – 20 °C im Gefrierschrank gelagert.

3.1.3 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, von den Firmen Acros (Geel, B), Sigma/Aldrich/Fluka (Taufkirchen) und Molecular Probes (Leiden, NL) bezogen und ohne weitere Reinigung eingesetzt. Die Polyvinylalkohole Mowiol 4-98 und Mowiol 15-88 waren Chemikalienspenden der Firma Hoechst (Frankfurt). Die aus zwei Zahlen zusammengesetzten Kenndaten geben die Viskosität einer 4 %-igen wässrigen Lösung bei 20 °C in mPas (erste Zahl) und den Hydrolysegrad in mol% (zweite Zahl) an^[51]. Die Photogelatine war eine Spende von den Deutschen Gelatine Fabriken Stoess (Eberbach). Chemikalien für Druckrezepturierungen wurden teilweise über die Firma Kremer-Pigmente (Aichstetten) bezogen. Die verwendeten Netzmittel waren eine Spenden der Firma Obermeier (Bad Berleburg-Raumland). Bei dem in den Versuchsvorschriften verwendeten Wassers handelte es sich um entmineralisiertes Wasser aus der gebäudeeigenen Wasseranlage.

Für die LC/MS Untersuchungen wurden nur Laufmittel der höchsten Reinheitsstufe verwendet, im Allgemeinen vom Typ Gradient Grade. Das verwendete Wasser entstammte einer Milliporeanlage.

3.2 Herstellung von Bakteriorhodopsin-Filmen und -Drucken

3.2.1 Filmherstellung

Die Herstellung von Bakteriorhodopsin-Filmen auf Bindemittelbasis erfolgte im Rakelauftrag (knife-coating). Hierzu wurde lyophilisiertes BR in eine entsprechende Polymerlösung eingebracht, falls benötigt die Photochromie über Hilfsstoffe eingestellt und mittels eines Aufziehgerätes vom Typ Film Applicator 2100 (Byk Gardner, Geretsried) auf das zu beschichtende Substrat aufgerakelt. Die Verfestigung des Polymers erfolgte bei gelierenden, wasserbasierten Beschichtung durch Abkühlung und Trocknung, bei einfachen Lacksystemen nur durch Trocknung ^[52]. Die Nassschichtdicke wurde über den Rakelspalt der jeweils verwendeten Rakel kontrolliert. Als Substrate wurden verschiedene Gläser und Polymerfolien verwendet.

Substratfreie Bakteriorhodopsin-Filme wurden durch Aufrakeln auf Polyesterfolien hergestellt. (Kurz, Fürth). Diese Folien zeigen bei guter Benetzbarkeit während des Rakelvorgangs, eine nur geringe Anhaftung des entstandenen Films, somit konnte in einem zweiten Schritt der Film von der Folie mühelos abgelöst werden.

3.2.2 Siebdruck

Die Herstellung von photochromen Druckerzeugnissen im Durchdruck erfolgte mittels Siebdruck. Die verwendeten wasserbasierten Siebdruckfarben setzen sich aus BR-Pigment, polymerem Bindemittel, Hilfsstoffen und Wasser zusammen ^[52]. Beim eigentlichen Druckvorgang wurde mittels eines von Hand ausgeführten Rakelzuges die Druckfarbe durch das siebförmige Gewebe der Druckform (Sieb) gepresst und auf das darunter liegende zu bedruckende Substrat übertragen ^[53]. Als Substrate wurden Papier vom Typ nopaPlus chlorfrei 80 g/m² (Nordland Papier, Dorpen) und Glossy-Papier vom Typ HP C3837A (Hewlett Packard, San Diego, USA) verwendet. Die Trocknung der Farbe erfolgte physikalisch durch Wegschlagen und/oder Verdampfen. Die Siebdrucke wurden auf einem Laborgerät des Typs S-30 (Fleischle, Brackenheim) ausgeführt. Als Siebgewebe wurde

ausschließlich die Größe 120T (45 μm Maschenweite, 34 μm Fadendurchmesser und 16 cm^3/m^2 theoretisches Farbvolumen) eingesetzt.

3.2.3 Tampondruck

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Druckfarben zur Herstellung von photochromen Druckerzeugnissen im Tiefdruck entwickelt (siehe Kapitel 5.2.2). Hierzu wurde der Tampondruck als indirektes Tiefdruckverfahren ausgewählt. Die entwickelten wasserbasierten Tampondruckfarben setzen sich aus BR-Pigment, polymerem Bindemittel, Hilfsstoffen und Wasser zusammen. Beim eigentlichen Druckprozess wird die Druckfarbe in die geätzten Vertiefungen der Druckform (Klischee) abgerakelt und in einem zweiten Prozess die Farbe vom Klischee mittels eines Silikongummis (Tampon) auf das zu bedruckende Substrat übertragen^[53].

Als Substrate wurden Glas, Papier vom Typ nopaPlus chlorfrei 80 g/m^2 (Nordland Papier, Dorpen) und Glossy-Papier vom Typ HP C3837A (Hewlett Packard, San Diego, USA) verwendet. Die Trocknung der Farbe erfolgte physikalisch durch Wegschlagen und/oder Verdampfung. Die Drucke wurden auf einer Tampondruckmaschine des Typs Colorsafe 60 LE (Tampoflex, Ditzingen) ausgeführt. Es wurden Tampons verschiedener Shore Härtegrade evaluiert. Als Druckform wurden Stahlklischees bestehend aus einer Stahlplatte mit hochpräziser und hochfein geläppter Oberfläche, in die das Motiv eingätzt wurde, verwendet. Zum Ätzen des Motivs wurde die Platte zunächst mit einem Fotoresistlack beschichtet. Das Druckbild wurde dann über einen Film aufbelichtet, die Lackschicht (Ätzreserve) entwickelt und schließlich die Platte geätzt. Die Herstellung der Klischees wurde von der Fa. Tampoflex (Ditzingen) ausgeführt.

3.3 Charakterisierung von Druckfarben und Drucken

3.3.1 Kontaktwinkelmessungen

Durch Kontaktwinkelmessungen kann u.a. das Benetzungsvermögen von Flüssigkeiten auf verschiedenen Substraten charakterisiert werden. Hierzu wird ein Tropfen Flüssigkeit auf die zu untersuchende, ebene Oberfläche aufgesetzt.

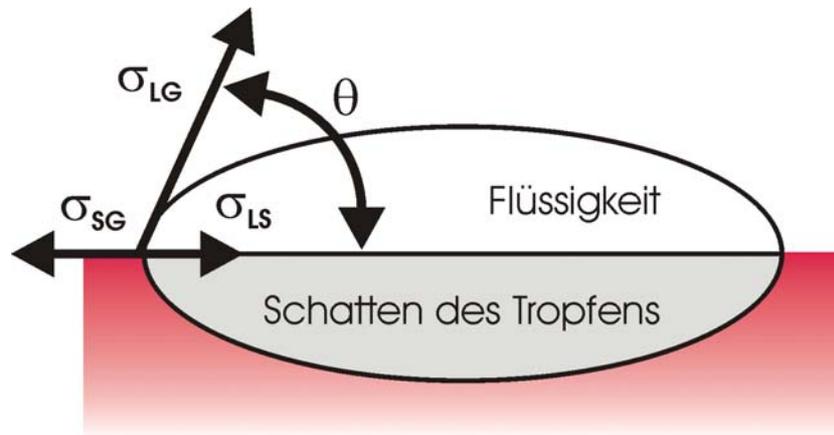


Abb. 8: Kontaktwinkelbildung auf einer Festkörperoberfläche nach Young.

Für das Grenzflächenspannungsparallelogramm (siehe Abb. 8) gilt nach Young ^[54]:

$$\sigma_{SG} = \sigma_{LS} + \sigma_{LG} \cos \theta + \pi_S \quad (2)$$

mit	σ_{SG}	Grenzflächenspannung Festkörper-Gasphase	
	σ_{LS}	Grenzflächenspannung Flüssigkeit-Festkörper	
	σ_{LG}	Grenzflächenspannung Flüssigkeit-Gasphase	
	θ	beobachteter Kontaktwinkel	
	π_S	Spreitdruck mit $\pi_S = \sigma_S - \sigma_{SG}$	(3)
	σ_S	Oberflächenenergie Festkörper	

Bei niedrigen Oberflächenenergien von Festkörpern ($\sigma_S < 50 \text{ mN/m}$) gilt $\sigma_{SG} \cong \sigma_S$ und damit $\pi_S \cong 0$.

Die Messung der Kontaktwinkel erfolgte mit Hilfe eines Kontaktwinkelmessgerätes vom Typ G10 gekoppelt mit einem Videomesssystem mit softwaregestützter Auswertung vom Typ DSA (Krüss, Hamburg). Ein Flüssigkeitstropfen von 2 mm bis 6 mm Durchmesser wurde mit Hilfe einer Spritze auf den Festkörper aufgebracht. Innerhalb dieser Tropfengröße stellt der Kontaktwinkel keine Funktion der Tropfengröße dar. Die Kontaktwinkelmessung erfolgte immer nach 1 min, da der Kontaktwinkel durch Veränderung des Lösungsvermögens der Flüssigkeit gegenüber dem Festkörper, Veränderung der Zusammensetzung der Flüssigkeit und/oder Sedimentationseffekte, eine Zeitabhängigkeit besitzt. Die Auswertung der Messungen erfolgte durch Anpassung der Young-Laplace Gleichung (4) an die Kontur des liegenden Tropfens:

$$\Delta p = \sigma \cdot \left(\frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2} \right) \quad (4)$$

mit Δp Druckdifferenz zwischen Innenseite und Außenseite des Tropfens
 σ Grenzflächenspannung
 r_1 / r_2 Hauptkrümmungsradien eines Flächenausschnitts der Tropfenoberfläche

Nach erfolgter Anpassung der Gleichung wurde der Kontaktwinkel als Steigung der Konturlinie im Dreiphasenkontakt ermittelt.

3.3.2 Rheologie

Die Rheologie ist die Lehre vom Fließ- und Deformationsverhalten der Stoffe. Rheometrische Untersuchungen basieren auf der Erzeugung von Scherfeldern und der Messung der Reaktion einer Substanz auf diese Felder. Neben der Charakterisierung des Deformations- und Fließverhalten von Stoffen eignen sich die Untersuchungen für die Simulation anwendungstechnischer Prozesse ^[55-57].

Es wurde ein Rotationsrheometer vom Typ EuroPhysics RHEO 2000 (Rheotec, Radeburg) mit Kegel-Platte-Meßsystem (C50-1) verwendet. Die zu untersuchende Probe befand sich zwischen Platte und Messkegel und wurde durch Rotation des Messkegels einer Scherbelastung ausgesetzt.

Zur Durchführung der rheologischen Messung wurde das Verfahren der Schergeschwindigkeitsvorgabe (CSR, controlled shear rate) eingesetzt. In dieser Methode wird die Drehzahl des Messkegels schrittweise vorgegeben und das resultierende Drehmoment detektiert. Als weitere Messmethode wurde bei vorgegebenen Schubspannung die Drehzahl detektiert (CSS, controlled shear stress).

Aus der Drehzahl ergibt sich bei bekannter Messkegelgeometrie die Schergeschwindigkeit:

$$D = \frac{v}{R \tan \beta} \quad (5)$$

mit	D	Schergeschwindigkeit
	v	Umfangsgeschwindigkeit des Messkegels
	R	Kegelradius
	β	Öffnungswinkel zwischen Messkegel und Platte

Das Drehmoment liefert die, als Schubspannung bezeichnete, pro Flächeneinheit auf die Probe angreifende Kraft:

$$\tau = \frac{M}{r \cdot A} \quad (6)$$

mit	τ	Schubspannung
	M	Drehmoment
	r	Radius der Platte
	A	Fläche der Platte

Aus Schergeschwindigkeit und Schubspannung ergibt sich die Scherviskosität der Probe:

$$\eta = \frac{\tau}{D} \quad (7)$$

mit	η	Scherviskosität
	τ	Schubspannung
	D	Schergeschwindigkeit

Für idealviskose Proben ist bei einer konstanten Temperatur die Scherviskosität eine Materialkonstante. Dieses idealviskose Verhalten wird auch als Newtonsches Fließverhalten bezeichnet. Idealviskoses Fließen zeigen zumeist nur Proben, die über keine oder nur geringen Molekülwechselwirkungen verfügen.

Abweichungen vom idealviskosem Verhalten werden als scherverdünnendes bzw. scherverdickendes Fließverhalten bezeichnet, je nachdem ob die Scherviskosität mit steigender Scherbelastung ab- bzw. zunimmt. Eine so genannte Fließgrenze liegt dann vor,

wenn eine Substanz erst dann zu fließen beginnt, wenn die von außen wirkenden Kräfte größer sind als die internen Strukturkräfte. Die Fließgrenze ist somit der Höchstwert der Schubspannung, bei welcher das Messgerät noch keine Bewegung erfasst.

Den reversiblen Strukturab- und -aufbau in Proben als Funktion der Zeit bei konstanter Belastung führt zum zeitabhängigen Fließverhalten. Die Scherviskosität ist nun eine Funktion der Zeit. Stoffe mit einer reversiblen Abnahme der Viskosität unter Belastung werden als thixotrop bezeichnet, solche bei denen die Viskosität zunimmt als rheopex.

3.3.3 Farbmessungen

Die Farbe eines Objektes ergibt sich aus dem Intensitätsspektrum der wellenlängenabhängigen Reflektion, wobei die, sich durch die Lichtquelle ergebende, Umgebungsfarbe und -helligkeit einen entscheidenden Einfluss hat ^[58]. Aus diesem Grund müssen die verwendeten Lichtquellen definiert werden. Eine für eine Farbmessung geeignete Lichtquelle muss kontinuierlich Energie über das gesamte sichtbare Spektrum abgeben. Eine Normlichtart wird durch die Menge der emittierten Energie bei jeder Wellenlänge definiert. Zur Farbbestimmung benutzte Lichtquellen sollten sowohl „unbunt“ sein, d.h. der Mittelpunktsvalenz entsprechen, als auch alle Wellenlängen des sichtbaren Bereichs enthalten, wobei keine Spektralfarbe dominieren sollte. Ein Maß für die Eignung einer Lichtquelle zur Farbwiedergabe wird durch den Farbwiedergabeindex R_a gegeben ^[59]. Normlichtart A ist normiertes Glühlampenlicht einer Verteilungstemperatur von 2856 K. Die Normlichtart C, die Tageslicht ohne UV-Anteil entspricht hat eine Verteilungstemperatur von 6750 K. Tageslicht inklusive UV-Anteil wird als Normlicht D65 bezeichnet. Es besitzt eine Farbtemperatur von 6500 K.

Das menschliche Auge ist nicht in der Lage die entstehenden Reflexionsspektren wahrzunehmen, stattdessen verfügt das Auge über drei unterschiedliche Rezeptoren mit unterschiedlichen Pigmenten (Trichromatizität).

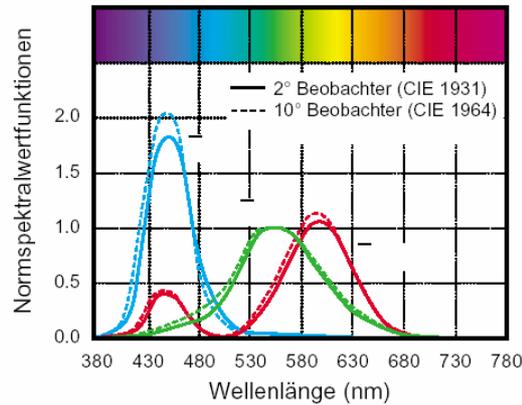


Abb. 9: Vergleich der spektralen Empfindlichkeit des menschlichen Auges eines 2°- (CIE 1931) und eines 10°-Normbeobachters (CIE 1964) ^[60].

Die Empfindlichkeitsmaxima dieser Zäpfchen liegen im roten, grünen und blauen Spektralbereich. Der Farbeindruck im menschlichen Auge entsteht somit durch additive Farbmischung der drei unterschiedlichen Farbrezeptoren. Der Farbeindruck einer Spektralfarbe lässt sich demnach durch additive Mischung, beispielsweise der von der CIE festgelegten Primärvalenzen (R = Rot, G = Grün und B = Blau), unterschiedlicher Lichter nachstellen. So kann für jede Spektralfarbe des sichtbaren Spektrums die Intensität der drei Primärvalenzen R, G und B ermittelt werden, die zur ihrer Darstellung benötigt werden. Durch mathematische Konversion ergeben sich die, in der Realität nicht nachstellbaren, virtuellen Primärvalenzen X, Y und Z (siehe Abb. 9) ^[58]. Die Gleichungen zur Berechnung der Normfarbwerte lauten:

$$X = \sum S(\lambda) \cdot R(\lambda) \cdot \bar{x}(\lambda) \quad (8)$$

$$Y = \sum S(\lambda) \cdot R(\lambda) \cdot \bar{y}(\lambda) \quad (9)$$

$$Z = \sum S(\lambda) \cdot R(\lambda) \cdot \bar{z}(\lambda) \quad (10)$$

mit $S(\lambda)$ genormte Strahlungsverteilung der Normlichtart ^[61]
 $\bar{x}(\lambda), \bar{y}(\lambda)$
 & $\bar{z}(\lambda)$ genormte Empfindlichkeit des Auges (siehe Abb. 9) ^[61]
 $R(\lambda)$ gemessener Reflektionswert

Weiterhin kommen die einzelnen Farbrezeptoren in unterschiedlichen Verteilungsdichten im Auge vor, so sieht das Auge an der Stelle des schärfsten Sehens, der Fovea centralis, lediglich dichromatisch. Die Zapfen mit dem Empfindlichkeitsmaximum im blauen Bereich sind hier

nicht vorhanden. Nur Proben, die ein Sehfeld kleiner als 4° besitzen, werden vollständig auf der Fovea abgebildet. Eine Person die einen Gegenstand mit einem Sehfeld von 4° betrachtet wird als 2° Beobachter (halber Öffnungswinkel des Sehfelds) bezeichnet. Somit sind die Primärvalenzen eine Funktion des Beobachters und müssen deshalb entsprechend für den jeweiligen Beobachter bestimmt werden. Der 2° und 10° Normalbetrachter sind hierbei die wichtigsten, wobei dem 10° Betrachter durch das weitere Gesichtsfeld, eine größere praktische Bedeutung zukommt.

Auch die Abmusterungsgeometrie hat einen Einfluss auf die Farbwahrnehmung. Bei der am häufigsten verwendeten 45/0 Geometrie wird die Probe unter einem Winkel von 45° zirkular beleuchtet und senkrecht zur Oberfläche unter 0° gemessen. Dies entspricht der normalen Abmusterungsbedingung des menschlichen Auges.

Somit ist die wahrgenommene Farbe eine Funktion der Strahlungsquelle, des Sehfelds (Beobachter) und der Abmusterungsgeometrie. Zur Darstellung von Farben wurden verschiedene Farbräume definiert, wobei der CIELAB ($L^*a^*b^*$) Farbraum, der visuellen Farbwahrnehmung des Menschen entsprechend, durch Berücksichtigung der visuellen Gleichabständigkeit der Farben angepasst wurde. Der CIELAB Farbraum basiert auf der Gegenfarben-Theorie, die besagt: Eine Farbe kann nie gleichzeitig Rot und Grün, noch gleichzeitig Gelb und Blau sein. Hieraus folgt, dass einzelne Zahlenwerte genügen, um die Gelb/Blau- und Rot/Grün-Eigenschaften einer Farbe hinreichend zu beschreiben ^[60].

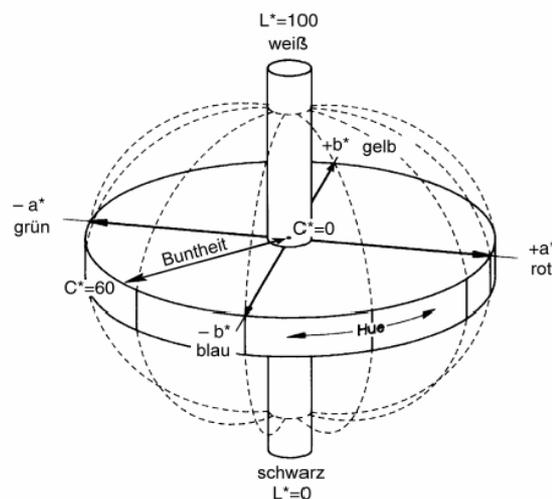


Abb. 10: Schematische Darstellung des L^*,a^*,b^* -Farbraums ^[60].

Wird eine Farbe in CIELAB dargestellt, so beschreibt L^* die Helligkeit, a^* den Rot/Grünwert und b^* den Gelb/Blauwert (siehe Abb. 10). Zur graphischen Darstellung wird ein rechtwinkliges Koordinatensystem verwendet, in dem die L^* , a^* und b^* Achse im rechten Winkel zu einander stehen. Die reinen Farbtöne hoher Sättigung liegen auf dem Rand der Scheibe. Die Sättigung nimmt zum Unbuntpunkt in der Mitte der Scheibe, an dem sie null beträgt, hin ab. Die zentrale L^* -Achse (Unbuntachse) zeigt $L^* = 0$ (Schwarz oder totale Absorption) am unteren Ende und $L^* = 100$ (ideales Weiß) am oberen Ende. In der Mitte der Ebene ist die Farbe Grau. Die CIELAB Koordinaten ergeben sich durch mathematische Konversion aus den virtuellen Primärvalenzen X , Y und Z .

$$L^* = 116(Y/Y_n)^{1/3} - 16 \quad (11)$$

$$a^* = 500[(X/X_n)^{1/3} - (Y/Y_n)^{1/3}] \quad (12)$$

$$b^* = 200[(Y/Y_n)^{1/3} - (Z/Z_n)^{1/3}] \quad (13)$$

mit X_n, Y_n & Z_n Werte der Weißreferenz für den Normbeobachter der verwendeten Lichtart.

Der Farbabstand zweier Proben ergibt sich nach:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})} \quad (14)$$

mit	ΔE	Farbabstand
	ΔL^*	Differenz auf der Helligkeitsachse
	Δa^*	Differenz auf der Grün-Rot-Achse
	Δb^*	Differenz auf der Gelb-Blau-Achse

Der L^*, a^*, b^* -Farbraum wurde nach dem empfindungsgemäßen Eindruck des menschlichen Auges so gewählt, dass der Farbabstand zwischen zwei beliebigen Farborten einem empfundenen Farbunterschied proportional ist. Im Allgemeinen gilt, dass das menschliche Auge einen Farbunterschied ab einem $\Delta E \geq 5$ erfassen kann.

Zur Beurteilung der Farbe von opaken Drucken und Lacken werden Farbmessgeräte verwendet^[58]. Die Messungen der Drucke und Lacke wurde mit einem Handmessgerät vom Typ Color-Guide 45/0 (BYKGardener, Geretsried) durchgeführt. Als Normlichtquelle wurde falls nicht anders angegeben D65/10° verwendet.

3.3.4 Photochromie

Wird ein Photozyklus basierend auf dem idealisierten Zweizustandsmodell (vgl. Kapitel 5.2.1.2) für BR zugrunde gelegt, vereinfacht sich die Betrachtung der Photochromie auf drei kinetische Reaktionen:

1. Photochemischer Übergang von B_{570} nach M_{410} (Bleichvorgang)
2. Thermische Relaxation von M_{410} nach B_{570}
3. Photochemischer Übergang von M_{410} nach B_{570}

Für den Anwendungsbereich als farbgebendes, photochromes Pigment in einer Sicherheitsdruckfarbe sind vor allem die ersten beiden Reaktionen von BR in Drucken und Lacken zu charakterisieren.

Zur Beurteilung der Bleichkinetik wurden zeitaufgelöste UV/vis-Reflektionsspektren mittels eines Farbmesssystems bestehend aus einer Kamera vom Typ Digital Camera DXM 1200 (Nikon, Düsseldorf) mit Makroobjekt und eingekoppeltem Faser-CCD-Array-Spektrometer vom Typ ADC 1000 USB / AVS-S2000 (Ocean Optics, Duiven, NL) aufgezeichnet. Die Reflektionsspektren können gemäß ASTM International in den CIELAB Farbraum transferiert werden (siehe Kapitel 3.3.3) ^[61]. Als Leuchtmittel für den Bleichvorgang wurden Glühlampen (100 W), Halogenlampen (20 W) und Leuchtstofflampen (9 W) verwendet. Die Beleuchtungsstärke wurde am Probenort mit Hilfe eines Luxmeters vom Typ Light Meter PeakTech 5025 (Heinz-Günter Lau, Ahrensburg) bestimmt.

Zur Charakterisierung der Relaxationskinetik wurden zeitaufgelöste UV/vis-Reflektionsspektren und Farbmessungen mittels eines Handmessgeräts vom Typ Color-Guide 45/0 (BYKGardener, Geretsried) aufgenommen. Das Handmessgerät wurde dem Farbmesssystem in diesem Fall vorgezogen, da es bei sehr niedrigen Lichtintensitäten misst und dadurch ein systematischer Fehler durch erneute Bleichung der Probe minimiert wird.

3.3.5 Lichtechtheit

Unter Lichtbeständigkeit wird die Beständigkeit von Druckfarben und Lacken gegenüber der Einwirkung von Licht im generellen verstanden. Die Lichtechtheit bezeichnet hingegen die Beständigkeit der Farbe des Drucks oder Lackes gegenüber der Einwirkung von Licht ^[53].

Die Prüfung auf Lichteinheit erfolgt klassisch durch Exposition der Proben in Tageslicht. Da diese Methode durch die langen Messzyklen sehr zeitaufwendig ist, werden bei der modernen Lichteinheitsprüfung Geräte mit künstlichem Licht hoher Intensität verwendet. Durch das intensive Licht einer Xenonbogenlampe, das durch entsprechende Filter an das Tageslichtspektrum angepasst wird, ist es möglich Messungen, die einer Besonnung von Monaten entsprechen, in wenigen Tagen durchzuführen. Zur Vergleichbarkeit wird üblicherweise ein Lichteinheitsmaßstab (Blauwollskala) mitbelichtet. Hierbei handelt es sich um genormtes, mit blauen Farbstoffen unterschiedlicher Lichteinheit eingefärbtes Wollgewebe. Sie werden in die Kategorien 1 (niedrigste Lichteinheit) bis 8 (höchste Lichteinheit) eingeteilt^[62].

Die Messungen zur Lichteinheit der Drucke wurden in einem Belichtungsgerät vom Typ XLS+ (ATLAS, Gelnhausen) durchgeführt. Der gewünschte Lichttyp konnte über geeignete Filter eingestellt werden. Falls nicht anders erwähnt, wurde durch einen Fensterglasfilter vom Typ ID65 (ATLAS, Gelnhausen) belichtet. Neben der Verwendung der Blauwollskala, können auch durch das Gerät die Bestrahlungsstärken in W/m^2 gemessen und somit reproduzierbare Messungen durchgeführt werden. Zusätzlich lässt sich am Gerät auch die Schwarzstandardtemperatur vorwählen und somit kann durch geeignete Parameter eine zu starke thermische Belastung der Probe ausgeschlossen werden.

3.4 Herstellung von TSG-Substraten

Die Darstellung der ultraglaten Template-stripped-Gold-Substrate (TSG) erfolgte frei nach Wagner et al.^[63], J. Diebel et al.^[64] und M. Hegner et al.^[65]. Hierzu wurde frisch gespaltener Glimmer vom Typ Muskovit (Plano, Wetzlar) in einem temperierbaren Hochvakuumsystem bei 300 °C mit Gold bedampft. Zur weiteren Verwendung wurde die dünne Goldschicht durch Verkleben mit einem Floatglasplättchen mittels Epoxidkleber vom Typ Epo-tec 377 (Polytec, Waldbronn) mechanisch verstärkt. Das Abheben der Substrate vom Glimmer geschah unmittelbar, bevor das TSG verwendet wurde.

3.5 Trennmethoden

3.5.1 Zentrifugation

Bei der Zentrifugation erfolgt die Trennung von Stoffen aufgrund ihrer unterschiedlichen Sedimentationsneigung in Abhängigkeit von der Zentrifugalkraft ^[66].

Durch die Zentrifugation können Proteine und Zellfragmente im präparativen Maßstab isoliert, konzentriert und gereinigt werden. Hierbei wird zwischen zwei Methoden unterschieden: Sedimentations- und Dichtegradientenzentrifugation.

Bei der Sedimentation setzen sich die Polypeptide in Abhängigkeit ihrer Sedimentationsneigung und der angelegten zentrifugalen Beschleunigung am Boden des Zentrifugenröhrchens ab. Diese Methode dient zur Trennung von Komponenten mit großen Molekularmassenunterschieden.

Bei der Dichtegradientenzentrifugation besteht das Zentrifugationsmedium aus einem Dichtegradienten, üblicherweise eine Zucker- oder Cäsiumchlorid-Lösung, dessen Dichte zum Boden des Röhrchens zunimmt. Die Applikation des zu trennenden Gemisches erfolgt oberhalb des Dichtegradienten im Röhrchen. Während der Zentrifugation wandern die einzelnen Komponenten so weit in den Gradienten hinein, bis die Dichte des umgebenden Gradienten genau ihrer eigenen Dichte entspricht. Durch die Dichtegradientenzentrifugation gelingt auch die Trennung von Komponenten mit vergleichsweise geringeren Massenunterschieden.

3.5.1.1 Sedimentationszentrifugation

Zur Sedimentationszentrifugation wurde je nach benötigter Zentrifugalkraft und Probenmenge eine Ultrazentrifuge vom Typ Centrikon T-1080 (Kontron Instruments jetzt Kendro, Langenselbold), eine Highspeedzentrifuge vom Typ Super T21 (Sorvall, Langenselbold) oder eine Tischzentrifuge Biofuge 13 (Heraeus Instruments, Langenselbold) eingesetzt.

3.5.1.2 Dichtegradientenzentrifugation

Die Zuckergradienten wurden mit Hilfe eines Gradientenmischers hergestellt. Es wurden 7 mL (30 % m/m) und 4 mL (45 % m/m) Saccharoselösung zum Ansetzen eines analytischen Standardgradienten verwendet.

Die Proben wurden auf den Zuckergradienten geschichtet und in einer Ultrazentrifuge vom Typ Centrikon T-1080 (Kontron Instruments jetzt Kendro, Langenselbold) zentrifugiert. Die Zentrifugation erfolgte mit 28,000 rpm und 4 °C für 19 h.

3.5.2 Dialyse

Die Dialyse kann zur Abtrennung von niedermolekularen Teilchen, wie z.B. Salzen, von Kolloiden oder Makromolekülen verwendet werden. Die Trennung erfolgt durch Diffusion der zu entfernenden Teilchen aus der Dispersion durch eine semipermeable Membran in das laufend erneuerte reine Lösungsmittel (meist Wasser) ^[67]. Die Membran muss hierbei so gewählt werden, dass die großen Teilchen in der Dispersion zurückgehalten werden.

Dialysiert wurde mit Dialyseschläuchen mittlerer Trenngröße (MWCO ca. 3.5 kDa) vom Typ Spectra/Por (Spectrum Medial Industries, Los Angeles, USA) gegen Wasser. Das Wasser wurde im Laufe der Dialyse mehrmals erneuert. Für kleine Probenmengen wurden Mikro dialysierkapseln vom Typ QuixStep (Roth, Karlsruhe) eingesetzt.

3.5.3 Filtration

Die Filtration wurde innerhalb der vorliegenden Arbeit klassisch zur Abtrennung von Feststoffteilchen aus Flüssigkeiten verwendet. Weiterhin wurden Filtrationen zusätzlich im Rahmen der Untersuchungen zur Teilchengrößeneinstellung/Homogenisierung zur Größenbestimmung der PM-Fragmente eingesetzt (vgl. Kapitel 4.3). Ein entscheidender Faktor bei der Filtration von PM ist, dass die verwendete Filtermembran ein geringes Proteinbindungsverhalten zeigt. Hier erwiesen sich Membranen aus Polyvinylidenfluorid (PVDF) als geeignet.

Zur Filtration wurden Spritzenvorsatzfilter vom Typ Durapore Millex-GV (Millipore, Bedford, USA) mit unterschiedlichen Porengrößen verwendet.

3.5.4 HPLC

Die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) ist die am häufigsten verwendete analytische Trenntechnik^[68]. Die Trennung von Substanzgemischen erfolgt hier, wie bei jeder chromatographischen Trennmethode, durch unterschiedliche Verteilungsgleichgewichte der einzelnen Komponenten. Diese Verteilungsgleichgewichte stellen sich zwischen der stationären Phase, hier die HPLC-Säule, und der mobilen Transportphase, hier der flüssige Eluent, ein. Somit erfolgt auf der Säule, durch unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten, eine Trennung und die Bestandteile eluieren zeitlich versetzt von der Säule.

In der vorliegenden Arbeit wurde die HPLC zur Trennung und Analyse von Proteinfragmenten mittels LC/MS (siehe Kapitel 3.6.4) eingesetzt.

3.6 Spektroskopische und spektrometrische Methoden

3.6.1 UV/vis-Spektroskopie

Die UV/vis-Spektroskopie befasst sich mit der absorptiven Wechselwirkung von Materie mit dem nahen ultravioletten und sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums^[68]. Die Extinktion oder auch Optische Dichte (OD) der absorbierenden Substanzen ist direkt proportional zu deren Konzentration (Lambert-Beersches-Gesetz):

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (15)$$

mit	E	Extinktion
	ε	molarer Extinktionskoeffizient
	d	Durchmesser der Küvette

Zur Untersuchung und Konzentrationsbestimmung von BR-haltigen Proben wurde ein UV-vis Zweistrahl-Spektrometer vom Typ Uvikon 922 (Kontron Instruments, Eching) verwendet.

Der kolloidale Charakter PM-haltiger Proben führt zu optischer Streuung, die als nichtabsorptiver Anteil an der Extinktion die absolute Konzentrationsbestimmung der Proben systematisch verfälscht. Die Streuung von BR-haltigen Proben wird durch die PM-Fragmente hervorgerufen, deren laterale Ausdehnung in der Größe der Wellenlängen der visuellen

Strahlung liegt. Durch die stark polymodale Teilchengrößenverteilung der PM-Fragmente innerhalb einer Probe ist eine rechnerische Untergrundanpassung schwer zugänglich. Gemäß allgemeingültiger Streulichttheorie kann vereinfachend die Streuung von PM als Kombination von Mie- und Rayleigh-Streuung beschrieben werden. Wobei die Mie-Streuung keine Funktion der Wellenlänge ist und die Rayleigh-Streuung umgekehrt proportional der 4. Potenz der Wellenlänge. Somit ergibt sich folgende Fitfunktion für den Streuuntergrund:

$$E = B + A\lambda^{-4} \quad (16)$$

mit E Extinktion
 B wellenlängenunabhängiger Anteil (Mie-Streuung ^[69])
 A wellenlängenabhängiger Anteil (Rayleigh-Streuung ^[69])
 λ Wellenlänge

Die Korrektur erfolgte durch Anpassen der Streukurve an den nichtadsorptiven Teil des Spektrums mit anschließender Subtraktion der angepassten Kurve.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde, falls nicht anders erwähnt, vereinfacht eine lineare Korrektur der Spektren durch Subtraktion des Streuuntergrundes, gemessen bei $\lambda = 800 \text{ nm}$, durchgeführt. Der Mie-Anteil der Streuung wurde somit vernachlässigt.

Tab. 5: Absorptionsmaxima und Extinktionskoeffizienten für membranintegriertes BR ^[70].

Zustand	$\epsilon / \text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$	Absorptionsmaxima / nm
B	62,700	568
M	45,000	410

3.6.2 Fluoreszenzspektroskopie

In der Fluoreszenzspektroskopie wird die von Materie emittierte ultraviolette und sichtbare Strahlung detektiert, die nach absorptiven Wechselwirkung mit derselben Strahlungsart verzögert ausgesandt wird ^[68]. Hierbei treten im Allgemeinen Verschiebungen des Emissionsspektrums zu längeren Wellenlängen bezogen zum Anregungs- bzw. Absorptionsspektrums auf. Diese Verschiebungen werden auch als Stokes-Verschiebungen bezeichnet.

Die Fluoreszenzmessungen wurden mit Hilfe eines Spectrofluorophotometers vom Typ RF-1502 (Shimadzu, Duisburg) durchgeführt.

3.6.3 Photonenkorrelationsspektroskopie

Bei der Photonenkorrelationsspektroskopie, ein dynamischen Lichtstreuverfahren, kann durch Messung der Streulichtintensitäten in Abhängigkeit von der Zeit auf die mittlere Teilchengröße von kolloidverteilten Stoffen geschlossen werden ^[69]. Unter dem Phänomen der Lichtstreuung wird die Summe der Effekte Reflexion, Brechung und Beugung zusammengefasst. Die Streulichtintensität von kolloiden Suspensionen unterliegt zeitabhängigen Schwankungen, hervorgerufen durch die Brownschen Molekularbewegungen der dispergierten Teilchen. Da eine Korrelation zwischen Teilchengröße und Diffusionsgeschwindigkeit besteht, kann aus den Schwankungen der Streulichtintensität auf die Teilchengröße zurückgeschlossen werden. Hierzu wird eine theoretische Korrelationsfunktion (17) an eine aus den Messwerten berechnete Autokorrelationsfunktion angepasst:

$$g[\tau] = e^{-2DK^2\tau} \quad (17)$$

mit	g	Autokorrelationsfunktion
	τ	Verzögerungszeit
	D	Diffusionskonstante
	K	Betrag des Streulichtvektors

Da der Betrag des Streulichtvektors und die Verzögerungszeit während der Messung konstant und rechnerisch zugänglich sind, ergibt sich die Diffusionskonstante. Sie ist nach der Stokes-Einstein Gleichung (18) antiproportional zum Teilchendurchmesser.

$$r = \frac{kT}{6\pi\eta D} \quad (18)$$

mit	r	Teilchenradius
	k	Boltzmannkonstante
	T	absolute Temperatur
	η	Dynamische Viskosität
	D	Diffusionskonstante

Die zu vermessenden Proben wurden mit dem entsprechendem Dispergiermedium verdünnt und in einem Partikel Sizer vom Typ N4 plus (Beckman Coulter, Krefeld) vermessen.

3.6.4 Massenspektrometrie

Mit Hilfe der Massenspektrometrie (MS) kann die Masse von Molekülen bestimmt und Aussagen über die Molekülkonstitution getroffen werden ^[67]. Ein Massenspektrometer besteht im Allgemeinen aus einer Ionenquelle, in der aus der Substanzprobe gasförmige Ionen erzeugt werden, einem Massenanalysator, der die Ionen hinsichtlich des Masse/Ladungs-Quotienten (m/z) auftrennt und schließlich einem Detektor, aus dessen Signal ein Massenspektrum berechnet wird. Aus dem Massenspektrum kann sowohl die quantitative Zusammensetzung der Probe, als auch die Molekülmasse der Probenbestandteile bestimmt werden.

Die Ionisierung der Analytmoleküle erfolgt durch Abgabe oder Aufnahme eines Elektrons. Die Ionisierung von biochemischen Proben für die massenspektrometrische Analyse geschieht allgemein durch milde Ionisationsverfahren, wie z.B. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) oder Electrospray Ionization (ESI). In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich das Verfahren der Electrospray Ionization verwendet. Hierbei tritt die Probenlösung aus einer Kapillare aus und es wird durch Anlegen einer Potentialdifferenz zwischen Kapillare und Eintrittsöffnung der Masse Ladung auf die Probenlösung übertragen. Aufgrund der elektrostatischen Wechselwirkung zerfällt der zur Eintrittsöffnung beschleunigte Flüssigkeitsstrahl in feine Tröpfchen die sowohl Probe, als auch Lösungsmittel enthalten. Darauf tritt ein kontinuierlicher Lösungsmittelverlust dieser Tröpfchen durch verdampfen ein, wobei die Ladungsdichte an der Tropfenoberfläche ansteigt. Erreicht die Flächenladungsdichte der Tropfen ein kritisches Maximum, tritt ein spontaner Zerfall der Tropfen in Mikrotropfen ein, dieser Vorgang wird auch als Coulomb-Explosion bezeichnet. Beim Transfer in das Massenspektrometer findet dann schließlich die Desolvatisierung der Analytmoleküle statt und durch Ladungstransfer werden die Analytionen gebildet.

3.6.4.1 Messung des Apoproteins mittels ESI-MS

Die Bildung von mehrfachgeladenen Ionen ist charakteristisch für die Electrospray Ionization, somit ergeben Peptide und Proteine im Massenspektrum eine Serie von Ionensignalen, die sich jeweils um eine Ladung (in der Regel durch Addition eines Protons bei Detektion im positiven Modus oder Subtraktion eines Protons im negativen Modus) unterscheiden. Somit

ergibt sich für das gemessene Masse-Ladungsverhältnis eines Ions im positiven Modus folgende Gleichung:

$$\frac{m}{z} \text{ von } (M + nH)^{n+} = \frac{M + nM_H}{n} \quad (19)$$

mit	m/z	Masse-Ladungsverhältnis des Ions
	M	Molekulargewicht Molekül
	n	Anzahl der addierten Protonen H
	M _H	Molekulargewicht eines Protons

Mittels mathematischer Iterationsverfahren kann aus den gemessenen Masse-Ladungsverhältnissen einer Serie von Ionensignalen die mittlere molare Masse des zu untersuchenden Moleküls bestimmt werden. Dieses, als Deconvolution ^[71, 72] bezeichnete Verfahren, wird in der Regel softwareunterstützt durchgeführt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Verfahren aus der Literatur zur massenspektroskopischen Bestimmung von unverdaulichem BR evaluiert und optimiert. Auf die Optimierung wird kurz im Kapitel Etablierung der massenspektroskopischen Analyse von BR eingegangen (siehe Kapitel 6.3.2). Letztendlich zeigte folgende Probenvorbereitung die höchste Reproduzierbarkeit und das beste Signal-/Rauschverhältnis.

Die gesamte Probenvorbereitung wurde in Kunststoffgefäßen ("Eppendorfcaps") durchgeführt um eine Kontamination der Proben mit Na⁺-Ionen, wie sie aus Glas herausgelöst werden können, zu verhindern. Dies ist für die Probenvorbereitung essentiell, da das Protein in denaturierter Form über eine starke Affinität gegenüber Na⁺-Ionen verfügt, die zu einer starken Peak-Verbreiterung im Massenspektrum führt. 20 µL BR-Suspension (OD ca. 30) wurden mit 1000 µL Ethanol versetzt, mit der Ultraschallsonde (siehe Kapitel 3.1.1.3) (1 s Schallintervall, 5 s Pausenintervall, 25 % Amplitude, 5 s Gesamtschallzeit) geschallt und für 2 min gevortext. Anschließend wurde die Suspension mit 500 µL *n*-Hexan versetzt, erneut geschallt (siehe oben) und für 2 min gevortext. Darauf wurde das Präzipitat in der Biofuge (5000 rpm, 3 min) sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1000 µL *n*-Hexan aufgenommen, erneut geschallt (siehe oben), für 2 min gevortext und in der Biofuge (siehe oben) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für 15 min an der Luft getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 10 µL Ameisensäure, 175 µL Wasser,

500 μL Methanol und 500 μL Chloroform aufgenommen, geschallt (siehe oben) bis zum Auflösen des Pellets und zentrifugiert (5000 rpm, 3 min). Der Überstand wurde über eine 20 μL Probenschleife in den Lösungsmittelfluss (Spritzenpumpe, Fluss 5 $\mu\text{L}/\text{min}$) des Massenspektrometers vom Typ LCQDuo (Thermo, Dreieich) injiziert und vermessen.

Lösungsmittel

- 10 μL Ameisensäure
- 175 μL Wasser
- 500 μL Methanol
- 500 μL Chloroform

ESI-MS-Parameter

- 225 °C heated capillary temperature
- 50 arb sheath gas
- 0 arb auxiliary gas
- 4.5 kV ESI needle voltage
- 1000 amu - 2000 amu spectral range

Massenspektren der Probe wurden über 7 min aufgezeichnet, durch Mittelwertbildung vereint und mittels der Software Bioworks 3.1 (Thermo, Dreieich) dekonvolutiert.

3.6.4.2 Messung des fragmentierten Proteins mittels LC/MS/(MS)

Die Massenspektrometrie kann auch zur Sequenzierung der Primärstruktur von Proteinen und Lokalisierung von biochemischen Modifikationen innerhalb der Primärstruktur eingesetzt werden. Für Proteine mit Molekulargewicht > 7 kDa ist es im Allgemeinen erforderlich das Protein mittels biochemischer Methoden in Fragmente geeigneter Größe zu zerlegen. Hier bietet sich eine enzymatische Fragmentierung mittels Proteasen oder eine chemische Fragmentierung mittels Bromcyan, *N*-Bromsuccinimid, Iodobenzoesäure etc. an. Das komplexe Fragmentgemisch wird dann mittels dem Massenspektrometer vorgeschalteter HPLC (siehe Kapitel 3.5.4) aufgetrennt und durch Electrospray Ionization ionisiert. Die Detektion im Massenspektrometer erfolgt dann, je nach Molekulargewicht des Proteins, als einfach oder mehrfach geladenes Ion. Die Sequenzierung der einzelnen Fragmentionen erfolgt durch weitere Fragmentierung mittels niederenergetischer Stöße der Ionen mit einem Kollisionsgas innerhalb des Spektrometers. Dieser Vorgang wird als collisionally induced decay (CID) und die entsprechenden Experimente als MS/MS-Analysen bezeichnet ^[73]. Die

Zuordnung der Fragmente erfolgt dann softwaregestützt aus den MS- und MS/MS-Spektren. Die Fragmente wurden entsprechend der gängigen Konvention benannt ^[74].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Verfahren zur Lokalisierung von biochemischen Modifikationen an oder innerhalb der BR-Sequenz entwickelt und optimiert. Auf die Entwicklung und Optimierung wird kurz im Kapitel Etablierung der massenspektroskopischen Analyse von BR eingegangen (siehe Kapitel 6.3.2). Letztendlich zeigte folgende Probenvorbereitung die höchste Reproduzierbarkeit und das beste Signal-/Rauschverhältnis.

2 mg BR wurden in 1000 µL Wasser suspendiert, für 30 s gevortext und in der Biofuge (13000 rpm, 15 min) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1000 µL Ethanol aufgenommen und mit der Ultraschallsonde (siehe Kapitel 3.1.1.3) (1 s Schallintervall, 5 s Pausenintervall, 25 % Amplitude, 5 s Gesamtschallzeit) geschallt und für 2 min gevortext. Anschließend wurde die Suspension mit 500 µL *n*-Hexan versetzt, erneut geschallt (siehe oben) und für 2 min gevortext. Darauf wurde das Präzipitat in der Biofuge (5000 rpm, 3min) sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1000 µL *n*-Hexan aufgenommen, erneut geschallt (siehe oben), für 2 min gevortext und in der Biofuge (siehe oben) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für 15 min an der Luft getrocknet. Das getrocknete Präzipitat wurde in 25 µL Trifluoressigsäure (TFA) gelöst und für 5 min im Ultraschallbad geschallt. Die Lösung wurde mit 10 µL Acetonitril und mit 15 µL Wasser versetzt, 30 s gevortext und für 5 min im US-Bad geschallt. Zur Lösung wurden 10 µL Bromcyan-Lösung (CNBr) (5 M) gegeben, das Reaktionsgefäß mit Stickstoff gespült und mit Parafilm versiegelt. Der Reaktionsansatz wurde im Thermoshaker bei 20°C für 18 h in der Dunkelheit inkubiert. Die Lösung wurde dann mit dem 300 µL Wasser versetzt und in der Vakuumzentrifuge (siehe Kapitel 3.8.3) getrocknet. Bis zur massenanalytischen Messung wurde die Probe unter Stickstoff bei -20 °C aufbewahrt. Für die Messung wurde die Probe in 10 µL TFA aufgenommen und für 30 s gevortext. Darauf wurde die Probe mit 267 µL 2-Propanol und 133 µL Acetonitril versetzt. Die Lösung wurde für 5min im Ultraschallbad geschallt. Schließlich wurde die Lösung mit 19.6 mL Wasser versetzt und für 30 s gevortext. Die Probe wurde über eine 5 mL Probenschleife in den Lösungsmittelfluss (400 µL/min) der HPLC vom Typ Spectra System P4000, UV 2000, SCM 1000 (Thermo, Dreieich) injiziert. Die Trennung der Fragmente erfolgte auf einer RP-Säule vom Typ ProntoSil 300-3-C8, 3 x 150 mm, SH 3.0 µm (Bischoff, Leonberg). Die eluierenden

Fragmente wurden in einem Massenspektrometer vom Typ LCQDuo (Thermo, Dreieich) vermessen. Es wurden MS- und MS/MS-Spektren auf das stärkste Precursorion aufgenommen.

Laufmittel A: 2-Propanol/Acetonitril (2:1 (v/v)), 0.1 % Ameisensäure (v/v)
 B: Wasser, 0.1 % Ameisensäure (v/v)

HPLC-Gradient 20 min kontinuierlich 2 % Laufmittel A und 98 % Laufmittel B
 15 min lineare Rampe von 2 % nach 15 % Laufmittel A
 90 min lineare Rampe von 15 % nach 65 % Laufmittel A
 10 min lineare Rampe von 65 % nach 98 % Laufmittel A
 40 min kontinuierlich 98 % Laufmittel A
 5 min lineare Rampe 98 % nach 2 % Laufmittel A

ESI-MS-Parameter 225 °C heated capillary temperature
 50 arb sheath gas
 0 arb auxiliary gas
 4.5 kV ESI needle voltage
 45 % ionization energy CID
 2 amu isolation band with
 400 amu - 2000 amu spectral range

Die aufgezeichneten MS- und MS/MS-Spektren wurden mittels der Software Qual Browser 1.3 (Thermo, Dreieich), Protein-Prospector MS-Product 4.05 (prospector.ucsf.edu)^[75] und Peptide Mass (www.expasy.org) ausgewertet.

3.7 Mikroskopische Methoden

Mit Hilfe von Mikroskopen können Objekte vergrößert beobachtet oder dargestellt werden. Als Auflösungsvermögen eines Mikroskops wird der Abstand zwischen zwei Objektpunkten angegeben, die im Bild eben noch als getrennt beobachtet werden können. Die Mikroskoptheorie nach Ernst Abbe definiert das Auflösungsvermögen (20):

$$A = \frac{\lambda}{NA} = \frac{\lambda}{n \sin \theta} \quad (20)$$

mit	A	Auflösungsvermögen
	λ	Wellenlänge der verwendeten Strahlung
	NA	numerische Apertur
	n	Brechzahl des Mediums zwischen Objekt und Objektiv
	θ	Winkel zwischen optischer Achse und Randstrahl des Objektivs

3.7.1 Lichtmikroskopie

Bei Lichtmikroskopen erfolgt die Vergrößerung mit Hilfe optischer Linsen. Die numerische Apertur des Objektivs kann bestenfalls einen Wert von ungefähr 2 erreichen, da der Winkel zwischen optischer Achse und Randstrahl $< 90^\circ$ und die Brechzahl des Mediums zwischen Objekt und Objektiv bei Verwendung von Immersionsölen höchstens bei 1.7 liegt ^[66]. Somit ergibt sich als maximales Auflösungsvermögen (21):

$$A_{\max} \approx \frac{\lambda}{2} \quad (21)$$

Das maximale Auflösungsvermögen liegt daher in der Lichtmikroskopie bei ca. 0.5 μm .

Zur durchlicht- und auflichtmikroskopischen Charakterisierung von Proben wurden Mikroskope mit optionalen Polarisierungseinheiten verwendet. Zum Einsatz kamen ein Stereomikroskop vom Typ SM 22-AD-140F ZOOM (Hund, Wetzlar) und ein Mikroskop vom Typ H 600 AM 50 (Hund, Wetzlar). Digitale Photographien wurden mit einer über einen Phototubus adaptierte Digitalkamera vom Typ Coolpix 950 (Nikon, Düsseldorf) ausgeführt.

3.7.2 Elektronenmikroskopie

In der Elektronenmikroskopie werden Elektronen für die Abbildung des Objektes verwendet. Als Linsen werden rotationssymmetrische elektrische und magnetische Felder verwendet. Wegen der sphärischen Aberration der Elektronenlinsen ist die Apertur mit ca. 0.01 relativ klein. Somit ergibt sich in Verbindung mit der de Broglie Wellenlänge der Elektronen als maximales Auflösungsvermögen (22):

$$A_{\max} \approx \frac{\lambda}{0.01} \approx \frac{\sqrt{150/U}}{0.01} \quad (22)$$

$$\text{mit } \begin{array}{l} \lambda \approx \sqrt{150/U} \text{ de Broglie Wellenlänge der Elektronen} \\ U \quad \quad \quad \text{Beschleunigungsspannung der Elektronen} \end{array} \quad (23)$$

Es werden zwei wesentliche Typen von Elektronenmikroskopen unterschieden: Transmissions- und Rasterelektronenmikroskope^[66].

Bei einem Transmissionsmikroskop wird das gesamte Objekt je nach seiner Struktur verschieden stark durchstrahlt. Die resultierende Intensitätsverteilung, gemessen durch einen Arraydetektor, wird in eine Helligkeitsinformation umgewandelt und als Abbild des Objektes dargestellt. Da hierbei die Objekte nur in Transmission beobachtet werden können, können aufgrund der geringen Eindringtiefe von Elektronen nur sehr dünne Schnittproben vermessen werden.

Bei der Rasterelektronenmikroskopie wird das Objekt rasterweise von einem feinen Elektronenstrahl abgetastet. Die Intensität der vom Objekt emittierten Sekundärelektronen wird von einem Detektor gemessen, in eine Helligkeitsinformation umgesetzt und bezüglich ihrer x-y-Objektcoordinate aufgetragen. Das sich daraus ergebende Abbild zeigt die Oberflächenstruktur des untersuchten Objektes. Da die Elektronen bei dieser Methode das Präparat nicht durchdringen müssen, ist die Dicke des Objekts ohne Belang. Nicht elektrisch leitende Proben müssen allerdings mit einem leitfähigen Überzug aus Kohlenstoff oder Metall beschichtet werden, da sie sich sonst unter Elektronenbeschuss aufladen und somit den Elektronenstrahl unkontrolliert ablenken würden.

Die zu untersuchenden Proben befanden sich je nach verwendeter Herstellungsmethode auf verschiedenen Substraten oder wurden auf diese aufgebracht. Das Substrat wurde dann mit Hilfe eines selbstklebenden Kohlenstoffpads auf dem Probenhalter fixiert. Zur Vermeidung von Aufladungsartefakten wurde mittels Kohlenstoff-Leitfähigkeitszement eine leitende Verbindung zwischen Probenhalter und Substrat hergestellt. Nichtelektrischleitende Proben wurden zusätzlich in einem Vacuum Coater vom Typ Auto 306 (BOC Edwards, Crawley, GB) mit Gold bedampft. Die Proben wurden in einem Rasterelektronenmikroskop vom Typ S-4100 (Hitachi Instruments, San Jose, USA) gemessen.

3.7.3 Rastersondenmikroskopie

In der Rastersondenmikroskopie wird eine Messsonde zwei- oder dreidimensional über die zu untersuchende Oberfläche bewegt. Hierbei wird die zwischen Prüfspitze und zu untersuchender Oberfläche auftretenden Kräfte gemessen^[66]. Je nach verwendeter Spitze und Messmethodik können so magnetische, elektrische oder andere wechselwirkenden Kräfte orts aufgelöst betrachtet werden. Bei der klassischen Rasterkraftmikroskopie (AFM) wird eine dreidimensionale Abbildung der Oberflächenstruktur des Präparates erhalten.

Da die Rasterkraftmikroskopie auf einem „nicht-optischen“ Prinzip basiert, wird das maximale Auflösungsvermögen nicht durch die Lichtdispersion bestimmt. Es können Strukturen bis zum atomaren Bereich aufgelöst werden.

Die zu untersuchenden Proben befanden sich je nach betrachteter Fragestellung auf verschiedenen Substraten. Handelte es sich um substratfreie Proben wurden diese auf Glimmer aufgebracht. Dieser Standardprobenträger besteht aus mit Glimmer beklebten Metallplättchen, wobei eine Schicht Glimmer mit Tesafilm zuvor abgehoben wurde, um eine möglichst ebene und saubere Oberfläche zu gewährleisten.

BR-Suspensionen wurden direkt und in den Verdünnungen mit Trispuffer (20 mM Tris, pH 8,0, 150 mM KCl) auf jeweils einen Probenträger aufgebracht. Nach 15 min wurden die so vorbereiteten Präparate mit Wasser gespült und getrocknet.

Die Messungen erfolgten mit Rastersondenmikroskopen vom Typ Explorer (Topometrix jetzt Veeco, Mannheim) und vom Typ Nanoscope IV (Veeco, Mannheim).

3.8 Weitere Methoden

3.8.1 Kleinwinkelstreuung

Mit Hilfe der Röntgenkleinwinkelstreuung können kristalline und teilkristalline Bereiche von makromolekularen Substanzen in der Größenordnung von 1 bis 100 nm untersucht werden. Abweichend von der klassischen Röntgenstrukturanalyse, die im Bereich der atomaren Auflösung arbeitet, wird bei kleineren Streuwinkeln, wie sie in der Röntgenkleinwinkelstreuung eingesetzt werden, im Allgemeinen ein diffuses Streubild erhalten, das Aussagen über die Raumgruppe und Gitterabstände der Substanzen ermöglicht.

Die Messungen erfolgten mit einer Kleinwinkelmessapparatur bestehend aus einem Röntgengenerator vom Typ PW1830 (Philips, Amsterdam, NL) und einer Kratky Kamera vom Typ KKK (Anton Paar, Graz, A).

3.8.2 Optische Aufbauten

Die Darstellung der verwendeten optischen Aufbauten und Messmethoden erfolgt parallel zur Darstellung und Diskussion der Ergebnisse.

3.8.3 Einengen und Trocknen von Proben

Das Entfernen von Lösungsmitteln aus Proben, um diese einzuengen oder zu trocknen, kann entweder durch Verdampfen oder durch Sublimation erfolgen. Diese Prozesse werden im Allgemeinen durch Anlegen eines Vakuums oder Erhitzen der Probe unterstützt.

Das Entfernen von Lösungsmitteln durch Verdampfen erfolgte mit Hilfe einer Speed Vac vom Typ Speed Vac Plus / Refrigerated Vapor Trap RVT 4104 (ThermoSavant, Dreieich). Hierbei wird durch schnelle Rotation der Probe ein Siedeverzug verhindert.

Das Entfernen von Lösungsmitteln durch Sublimation erfolgte mit Hilfe einer Gefriertrocknungsanlage vom Typ Alpha 2-4 (Christ, Osterode am Harz) (siehe Kapitel 3.1.1.4).

3.8.4 Einstellen der Feuchtigkeit von Drucken und Filmen

Die Feuchtigkeit von Filmen und Drucken wurde durch Lagerung in einem Klimaschrank vom Typ KBF 115 (WTB Binder, Tuttlingen) eingestellt. Die Lagerzeit betrug bei geringen Feuchtigkeitsunterschieden zwischen Ausgangs- und Endfeuchtigkeit mindestens 24 h, bei größeren Differenzen mindestens 48 h.

3.8.5 pH-Messung

Die gerätegestützte pH-Messung erfolgt direktpotentiometrisch mit einer protonenselektiven Glaselektrode ^[68].

Zur pH-Messung wurde ein pH-Meter vom Typ HI 9017 Microprocessor pH Meter (HANNA instruments, Kehl am Rhein) verwendet.

3.8.6 Digitalphotographie

Die moderne Digitalphotographie ermöglicht eine schnelle und einfache Protokollierung von visuellen Versuchsergebnissen.

Digitale Photographien wurden mit einer handelsüblichen Digitalkamera vom Typ Coolpix 950 (Nikon, Düsseldorf) ausgeführt.

4 Charakterisierung der relevanten BR Eigenschaften

Wie bereits eingangs erwähnt, befasst sich die vorliegende Arbeit verstärkt mit der Erforschung und Entwicklung neuer technischer Anwendungsbereiche von Einsatz Bakteriorhodopsins. Thematisch gliedert sie sich in zwei Teile. Zum einen die Entwicklung und Charakterisierung eines multifunktionalen Sicherheitsmerkmals auf der Basis von Bakteriorhodopsin und zum anderen die Verwendung von Bakteriorhodopsin in Hybridbiosystemen bzw. Biohybridsystemen.

Die Grundlage für die Erschließung neuer Applikationen oder Integration in bestehende Anwendungsbereiche stellen die physiko-chemischen Eigenschaften der PM dar. Im Folgenden sollen die für diese Arbeit technisch relevantesten Eigenschaften charakterisiert werden.

4.1 Interaktion von BR mit Matrices

Als wichtigste Voraussetzung für die nasschemische Umsetzung in Lösungsmitteln und Einbettung in polymere Matrices, ist der Erhalt der Tertiärstruktur des Proteins anzusehen. Denn an die Tertiärstruktur ist die biologische Funktion als lichtgetriebene Protonenpumpe gebunden, aus der sich die technischen Anwendungen ableiten ^[8, 9].

Durch die Ausbildung eines zweidimensionalen Kristallgitters während der Membranintegration und durch die umgebenden Lipidmoleküle wird die Tertiärstruktur extrem stabilisiert. Deshalb ist Bakteriorhodopsin in membranintegrierter Form weitgehend tolerant gegenüber chemischen und physikalischen Einflüssen ^[15, 32]. Wird dieser kristalline Verband allerdings z.B. durch Solvataion aufgelöst, verliert das Protein seine hohe Stabilität gegenüber seiner Umgebung. Dieser Vorgang geht meistens mit einem Verlust der Tertiärstruktur einher. Somit ist nur eine technische Verwendung von membranintegriertem Bakteriorhodopsin in Form von Purpormembranfragmenten sinnvoll.

4.1.1 Lösungsmittelstabilität und Aggregation

Die Interaktion von PM mit Lösungsmitteln wurde bereits im Rahmen der Diplomarbeit charakterisiert ^[76] und soll hier nur verkürzt dargestellt werden.

Allgemein lassen sich Lösungsmittel bezüglich des Verlustes der Tertiärstruktur (Denaturierung) des in ihnen suspendierten Bakteriorhodopsins in drei Kategorien einordnen:

1. *Hydrophile Lösungsmittel*, wie Glycerin oder Wasser, führen zu keiner Denaturierung von Bakteriorhodopsin.
2. *Hydrophobe Lösungsmittel*, wie Chloroform, Benzol oder Hexan, führen in der Abwesenheit von Wasser ebenfalls nicht zu einer Denaturierung.
3. *Ambivalente Lösungsmittel*, die sowohl über einen hydrophoben als auch hydrophilen Charakter verfügen wie Ethanol oder Dimethylsulfoxid, führen zur Denaturierung.

Eine Denaturierung tritt also bevorzugt dann auf, wenn ein Solvens sowohl über hydrophobe als auch hydrophile Eigenschaften verfügt.

Die Ausbildung der Tertiärstruktur während der Membranintegration des Bakteriorhodopsins erfolgt so, dass fast alle hydrophoben Polypeptidsegmente sich innerhalb der Membran befinden ^[29-31]. Somit müssen nach Mitaku et al. ^[77] Lösungsmittel über einen hydrophoben Charakter verfügen, um in die Membran eindringen zu können. Davon ausgehend, dass die Tertiärstruktur weitgehend durch Wasserstoffbrückenbindungen und Ionenpaarbindungen zwischen den α -Helices stabilisiert wird, kann ein Lösungsmittel, das neben seinen hydrophoben Eigenschaften auch über eine hydrophile Gruppe verfügt, diese stabilisierenden Bindungen lösen. Dieser, zu einer Destabilisierung der tertiären Struktur führende Prozess, äußert sich in der Abnahme des opsin-shift. Erreicht das Lösungsmittel letztendlich eine kritische Konzentration innerhalb der Membran erfolgt die irreversible Freisetzung des Chromophors Retinal unter völligem Verlust des opsin-shift. Somit kann das Bakteriorhodopsin bei einem irreversiblen Farbwechsel von lila nach gelb als denaturiert angesehen werden. Dieser Farbwechsel ist somit als gesichertes Kriterium zur Beurteilung von Matrices auf ihre Verträglichkeit zu PM anzusehen, im Folgenden auch als Matrixkompatibilität bezeichnet.

Eine quantitative Klassifizierung der Solventien bezüglich ihrer Matrixkompatibilität wurde von Eisenbach und Caplan durchgeführt ^[78, 79]. Die hierzu verwendeten Löslichkeitsparameter

beruhen auf der Kohäsionsenergiedichte der Flüssigkeit, die sich aus der Verdunstungsenthalpie und dem molaren Volumen des Lösungsmittels ergibt:

$$\delta = \sqrt{e} = \sqrt{\frac{E}{\bar{V}}} = \sqrt{\frac{\Delta H - RT}{\bar{V}}} \text{ (MPa)} \quad (24)$$

mit	δ	Löslichkeitsparameter
	e	Kohäsionsenergiedichte
	\bar{V}	molare Volumen
	E	Kohäsionsenergie
	ΔH	Verdunstungsenthalpie
	R	Gaskonstante
	T	absolute Temperatur

Der Löslichkeitsparameter kann bezüglich der auftretenden Kräfte in seine Bestandteile zerlegt werden:

$$\delta^2 = \delta_d^2 + \delta_p^2 + \delta_h^2 \quad (25)$$

mit	δ	Löslichkeitsparameter
	δ_d	Löslichkeitsparameter bezüglich der Dispersionskräfte (London-WW)
	δ_p	Löslichkeitsparameter bezüglich der polaren Kräfte
	δ_h	Löslichkeitsparameter bezüglich der Wasserstoffbrückenbindungskräfte

Die einzelnen Werte sind über den Brechungsindex, den Dipolmoment und der Verdunstungsenthalpie der Flüssigkeit zugänglich. Für eine Vielzahl von Lösungsmitteln wurden diese Parameter bestimmt ^[80].

Um nun die Löslichkeitsparameter bezüglich ihrer Verträglichkeit mit Bakteriorhodopsin aufzutragen, wird eine weitere Größe definiert:

$$\delta_v = \sqrt{\delta_d^2 + \delta_p^2} \quad (26)$$

mit	δ_v	Löslichkeitsparameter der van der Waals Interaktionen
	δ_d	Löslichkeitsparameter bezüglich der Dispersionskräfte (London-WW)
	δ_p	Löslichkeitsparameter bezüglich der polaren Kräfte

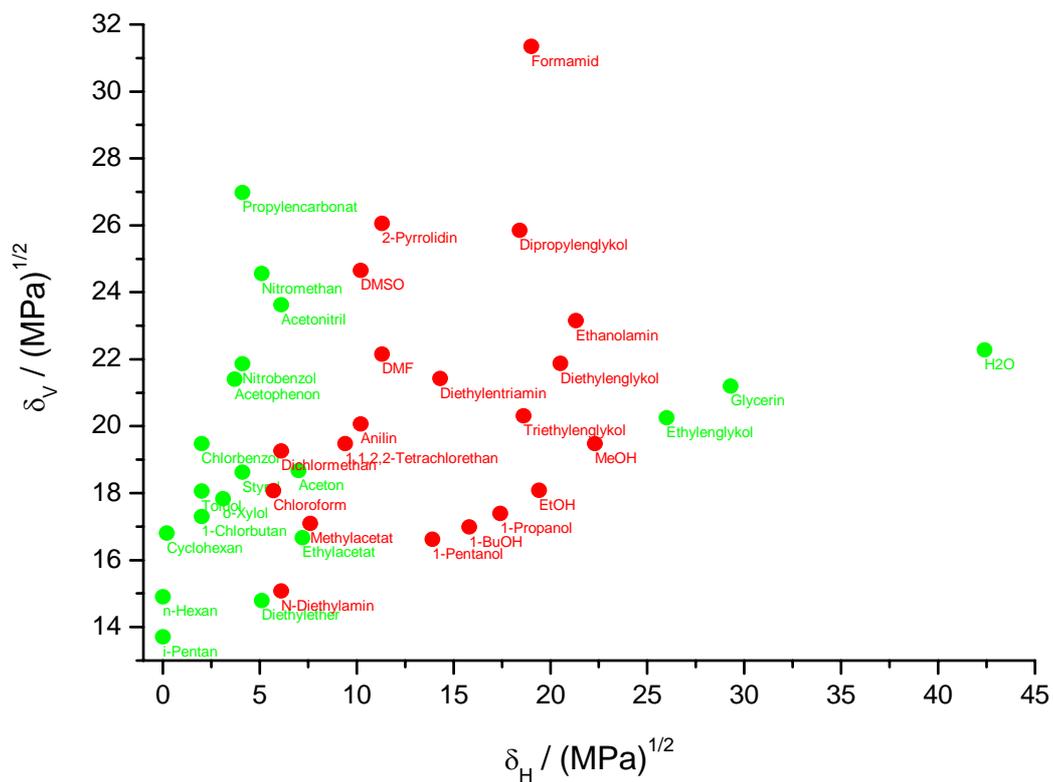


Abb. 11: Diagramm der Matrixkompatibilität von PM Kompatible Lösungsmittel sind grün, inkompatible rot dargestellt.

Die im Diagramm aufgetragenen Flüssigkeiten lassen sich anhand ihres Löslichkeitsparameters bezüglich der Wasserstoffbrückenbindungskräfte in die bereits eingangs klassifizierte Gruppen, hydrophobe, hydrophile und ambivalente Lösungsmittel, einteilen. Somit ist die zu Beginn getroffene qualitative Aussage zur Lösungsmittelstabilität von Bakteriorhodopsin mit Hilfe der Löslichkeitsparameter quantifiziert worden.

Somit ist eine Voraussage der Stabilität von Bakteriorhodopsin in verschiedenen Lösungsmitteln oder Lösungsmittelgemischen möglich. Es ist davon auszugehen, dass keine Denaturierung eintritt solange sich die Löslichkeitsparameter des verwendeten Solvens oder Solvensgemisches außerhalb des für Bakteriorhodopsin kritischen Bereiches von ca. $\delta_h = 5 (\text{MPa})^{1/2}$ bis ca. $\delta_h = 25 (\text{MPa})^{1/2}$, befindet.

Mit Hilfe dieser Klassifikation kann die Matrixkompatibilität von PM auch für einphasige Lösungsmittelgemische prognostiziert werden. Die Löslichkeitsparameter des Gemisches

werden aus den Löslichkeitsparametern der Einzelkomponenten über ihre Volumenbestandteile berechnet.

Da diese Löslichkeitsparameter auch für Polymere bestimmt worden sind^[80], können auch für die Einbettung von Bakteriorhodopsin in polymere Matrices sinnvolle Voraussagen getroffen werden.

Neben diesen allgemeinen Aussagen zur Lösungsmittelstabilität, ist die Dispergierbarkeit von Bakteriorhodopsin in einem Solvens von entscheidender Bedeutung. In den zuvor als matrixkompatibel eingestuften Lösungsmitteln wurde der Versuch unternommen, lyophilisiertes Bakteriorhodopsin mit der Ultraschallsonde (siehe Kapitel 3.1.1.3) zu dispergieren. Der erreichte Dispersionsgrad wurde visuell mit dem in Wasser verglichen und beurteilt.

Das Dispergieren von Bakteriorhodopsin in Wasser bereitet keine Schwierigkeiten. In stark hydrophoben Lösungsmitteln, wie z.B. Cyclohexan oder Hexan hingegen tritt eine starke Aggregation der Purpurmembranfragmente auf. Da die gebildeten Aggregate zur Sedimentation neigen können keine stabilen Dispersionen hergestellt werden. Die Ergebnisse für weniger hydrophobe Lösungsmittel waren uneinheitlich. Mit den Lösungsmitteln Xylol, Toluol und Chlorbutan kann eine Zone im Diagramm (siehe Abb. 11) beschrieben werden in der im Vergleich zu den übrigen hydrophoben Solventien eine erhöhte Dispergierbarkeit von Bakteriorhodopsin eintritt. Weiterhin zeigt auch Propylencarbonat eine für hydrophobe Lösungsmittel erhöhte Dispergierbarkeit.

4.2 Temperaturstabilität

Membranintegriertes Bakteriorhodopsin besitzt im Vergleich zu anderen Proteinen eine ungewöhnliche Stabilität gegenüber thermischer Belastung. Die Temperaturstabilität des BR ist hierbei abhängig vom Feuchtegrad und pH-Wert. Die Tertiärstruktur und damit die Funktion bleibt bis 80 °C in Suspension und bis 140 °C im lyophilisiertem Zustand bzw. trockenen Polymerschichten erhalten^[81].

4.3 Teilchengrößeneinstellung

Die nach Standardprozeduren ^[28] hergestellte PM liegt als polymodale Teilchenmischung mit stark heterogener Größenverteilung vor (siehe Abb. 12). Die Fragmentgröße und Verteilung ist eine Funktion sowohl der Zuchtbedingungen der Archae, als auch der verwendeten Isolations- und Aufarbeitungsprozesse. Die Fragmente sind von unregelmäßiger Form und können über eine laterale Ausdehnung von 100 nm bis zu 1 μm verfügen ^[15, 32].

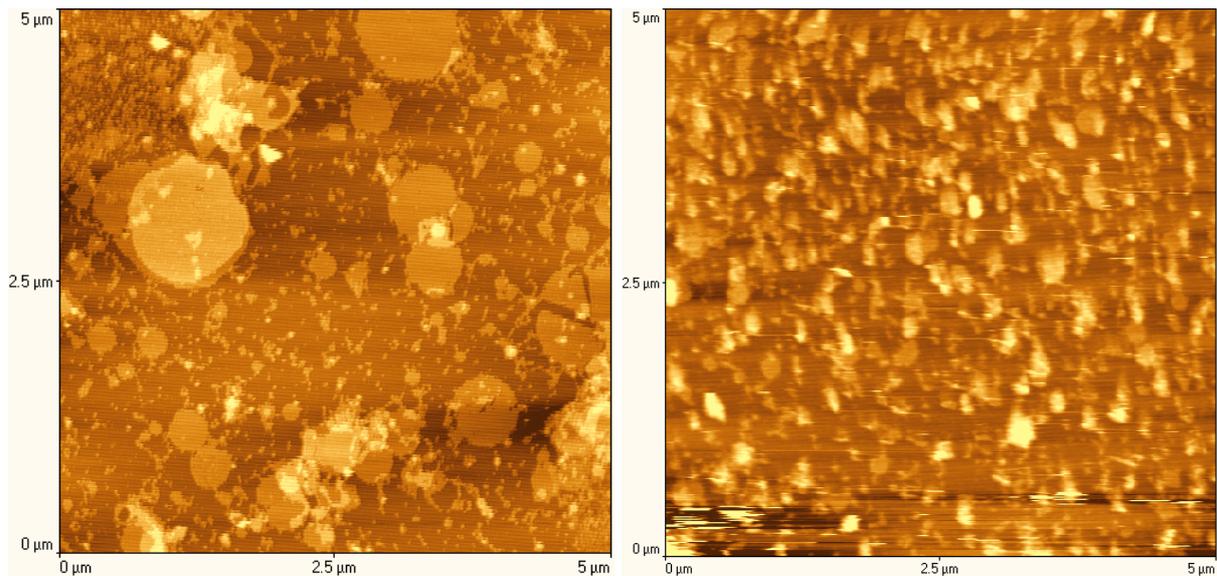


Abb. 12: AFM Aufnahme von PM-Fragmenten auf Glimmer adsorbiert. Links: Probe vor der Homogenisierung. Rechts: Proben nach der Homogenisierung mittels Hochdruckhomogenisator (HDH).

Grundlegend für die Integration in bestehende Prozesse oder die Erschließung neuer Applikationen ist ein definiertes reproduzierbares physiko-chemisches Verhalten des BR. Hierzu trägt eine homogene, möglichst monomodale Teilchengröße der PM Fragmente entscheidend bei. Deshalb wurde ein Verfahren zur Homogenisierung bzw. Teilchengrößeneinstellung von Purpurmembran entwickelt.

Im Rahmen der Entwicklung wurden die zwei Techniken - Ultraschall und Hochdruckhomogenisation - zur Homogenisierung evaluiert (siehe Kapitel 3.1.1.3). Die Untersuchungen wurden hierbei an der Mutante D96N durchgeführt, da diese in größeren Mengen zur Verfügung stand. Die Ergebnisse sind auf andere Mutanten übertragbar, solange durch die Mutation die Membranintegrität unverändert bleibt.

Im Verlaufe der Untersuchungen zeigte sich, dass die Behandlung von PM Suspensionen mit der Ultraschallsonde (USS) oder im Hochdruckhomogenisator (HDH) zur Teilchengrößeneinstellung genutzt werden kann.

Vereinfacht wurde davon ausgegangen, dass bei gleicher OD (bezogen auf $\lambda = 570$ nm) der Streuuntergrund als Maß für die PM-Patchgröße herangezogen werden kann. Die Streuuntergrundreduzierung, also die konsekutive Abnahme der mittleren Patchgröße, wurde mittels UV/vis-Spektroskopie untersucht. Hierbei kann der Bereich der nichtcharakteristischen Absorption im vis-Spektrum ($325 \text{ nm} \leq \lambda \leq 425 \text{ nm}$) zur Bestimmung des Streuuntergrundes herangezogen werden. Es ist davon auszugehen, dass in diesem Bereich keine Absorption und somit nur Streuung durch PM-Patches auftritt (siehe Kapitel 3.6.1). Reduziert sich der Betrag des Streuuntergrundes - OD zwischen $\lambda = 325$ nm und $\lambda = 425$ nm - sinkt somit auch gleichzeitig die mittlere PM-Patchgröße. Der Prozess wird als abgeschlossen angesehen, wenn keine weitere Reduzierung des Streuuntergrundes eintritt (siehe Abb. 13).

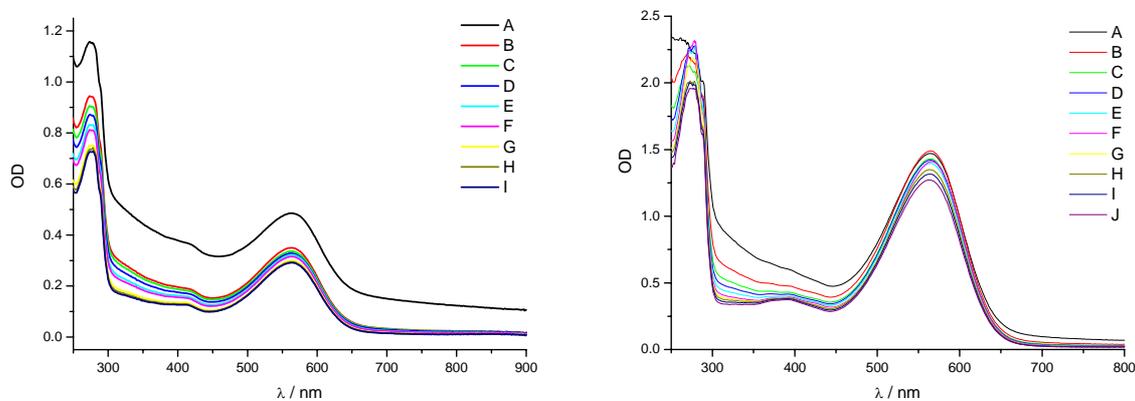


Abb. 13: UV/vis-spektroskopische Verfolgung der Streuuntergrundreduzierung einer in konsekutiven Schritten homogenisierten PM-Suspension (OD 20, zur Messung verdünnt). Links: Hochdruckhomogenisator (HDH), Rechts: Ultraschallsonde (USS).

Deutlich ist in Abb. 13 die kontinuierliche Abnahme des Streuuntergrundes ausgehend von der unbehandelten Probe A (HDH/USS) bis zur Probe I (HDH) bzw. J (USS) zu sehen. Die um den Streuuntergrund korrigierte OD bei $\lambda = 570$ nm, also die Konzentration an BR, bleibt hierbei weitgehend konstant. Deutlich ist dies in den letzten Homogenisierungsschritten G (HDH/USS) bis I (HDH) bzw. J (USS) zu sehen. Eine merkliche Denaturierung des BRs während der Homogenisierung kann also ausgeschlossen werden. Weiterhin ist zu erkennen,

dass ab dem Homogenisierungsschritt G (HDH/USS) keine weitere Minimierung des Streuuntergrundes eintritt. Die Homogenisierung, im Rahmen der für die Durchführung gewählten Bedingungen, kann als abgeschlossen angesehen werden.

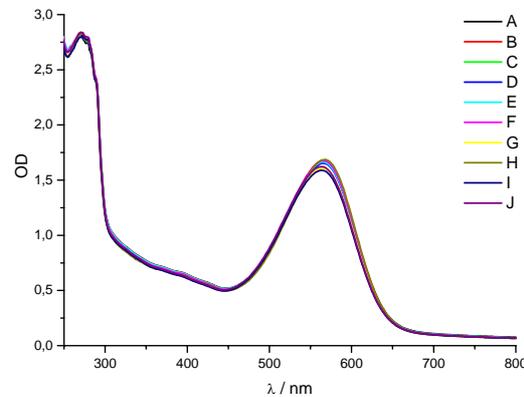


Abb. 14: UV/vis-spektroskopische Verfolgung der Streuuntergrundreduzierung einer in konsekutiven Schritten im Ultraschallbad (USB) homogenisierten PM-Suspension (OD 20, zur Messung verdünnt).

Zum Vergleich wurde der Versuch unternommen eine Probe im Ultraschallbad (USB) zu homogenisieren (siehe Kapitel 3.1.1.3). Die UV/vis-spektroskopischen Messungen zeigen keine Streuuntergrundreduzierung. Somit reicht die durch das Ultraschallbad eingetragene Leistungsdichte nicht aus, um die Probe zu homogenisieren (siehe Abb. 14).

Zur Bestimmung der Patchgröße wurden die verdünnten Proben I (HDH), Probe J (USS) und Probe A (HDH/USS) konsekutiv durch Filter mit abnehmender Porengröße filtriert und jeweils ein UV/vis-Spektrum des Filtrats gemessen (siehe Kapitel 3.5.3).

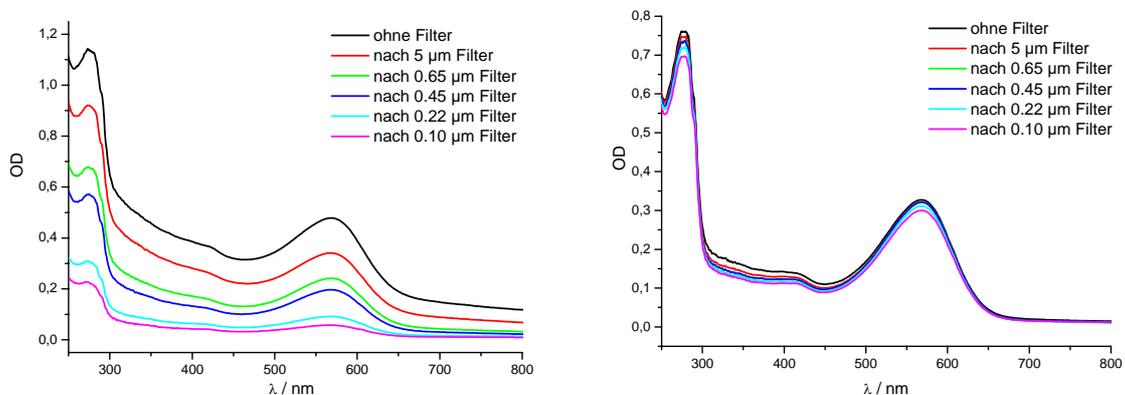


Abb. 15: UV/vis-spektroskopische Verfolgung der OD-Änderung einer in konsekutiven Schritten durch Filter mit abnehmender Porengröße gefilterten PM-Suspension. Links: Unbehandelte Probe A (HDH) der Hochdruckhomogenisation. Rechts: Homogenisierte Probe I (HDH) nach Hochdruckhomogenisation.

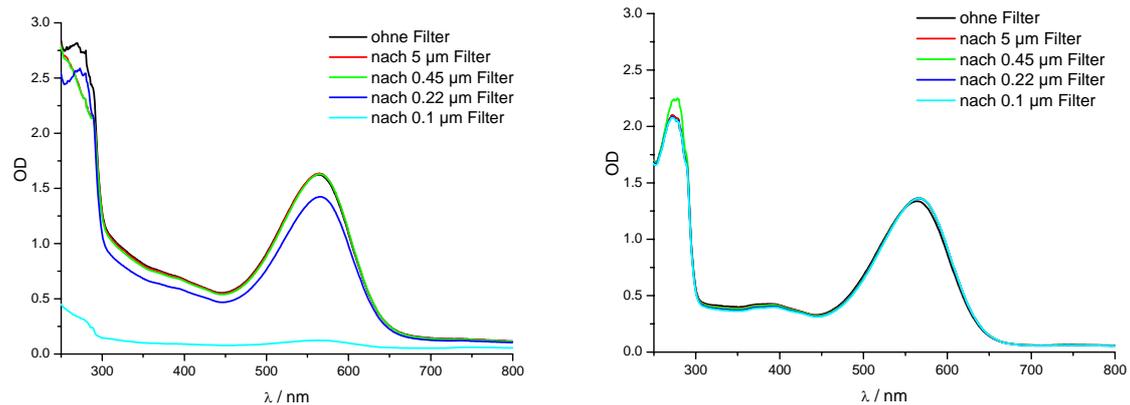


Abb. 16: UV/vis-spektroskopische Verfolgung der OD-Änderung einer in konsekutiven Schritten durch Filter mit abnehmender Porengröße gefilterten PM-Suspension. Links: Unbehandelte Probe A (USS) der Ultraschallsondenhomogenisation. Rechts: Homogenisierte Probe J (USS) nach Ultraschallsondenhomogenisation.

Deutlich ist für die Probe A (HDH/USS) in Abb. 15 und Abb. 16 die Abnahme der OD bei $\lambda = 570$ nm und damit der Verlust an BR-Konzentration durch konsekutive Filterung zu erkennen. Es ist also davon auszugehen, dass in der unbehandelten Referenzproben A die Mehrzahl der PM-Patches wesentlich größer als 0.10 μm ist. Die mittels Hochdruckhomogenisation bzw. Ultraschallsonde behandelte Probe I (HDH) bzw. Probe J (USS) zeigten hingegen eine fast konstante OD bei 570 nm bzw. BR-Konzentration bei konsekutiver Filterung. Eine Degradation des Materials durch den Wärmeeintrag der Ultraschallsonde wurde nicht beobachtet. Die durchschnittliche Teilchengröße ist nach der Homogenisierung also ≤ 0.10 μm .

Zur Absolutbestimmung der Patchgrößen wurde die Photonenkorrelationsspektroskopie verwandt (siehe Kapitel 3.6.3). Die Größenbestimmung mittels PCS beruht auf der Detektion und Analyse der Brownschen Bewegung (Translations-Diffusion) der zu untersuchenden Partikel. Hierbei ist eine starke Abweichung der Partikel von der angenähert sphärischen Form als problematisch anzusehen. Ist das Achsenverhältnis größer als 20:1, unterliegen die Partikel neben der Translations-Diffusion auch der Rotations-Diffusion. Weiterhin können auch biegsame Partikel durch ihre Biege-Zeitkonstanten zur Komplexität des aufgenommenen Signals beitragen ^[82]. PM-Patches weichen durch ihre eher blattartige Struktur mit Achsenverhältnissen von 20:1 (0.1 μm) bis 200:1 (1 μm) stark von der sphärischen Form ab. Somit sind die Messergebnisse für PM-Patches um 0.1 μm als absolut anzusehen, für Patches $\gg 0.1$ μm ist mit dem Auftreten eines systematischen Fehlers durch die Abweichung von der

sphärischen Form zu rechnen. Zwar kann durch Verwendung kleiner Streuwinkel, bezogen auf die geometrische Anordnung von Lichtquelle und Detektor, der systematische Fehler, der auf der Biegung und Rotation der Patches beruht, minimiert werden, allerdings ist die relative Streuintensität bei kleinen Winkeln stark abhängig vom Partikeldurchmesser (siehe Abb. 17). Der PCS-Theorie zufolge werden somit Komponenten einer polymodalen Probe mit größerem Durchmesser bei kleinen Streuwinkeln stärker gewichtet.

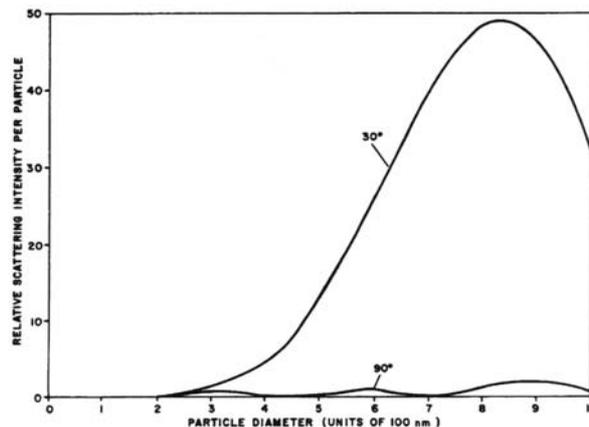


Abb. 17: Die relative Streulichtintensität als Funktion des Partikeldurchmesser bei einem Streuwinkel von 30° und 90°. Abb. aus ^[83].

Dies führt zu einer starken Verfälschung des Messwerts, wenn in einer Population von kleinen Partikeln große Partikel anwesend sind. Deutlich ausgeprägt zeigte sich dieser Effekt bei Vergleichsmessungen der Proben mit einem Streuwinkel von 11.1° (siehe Tab. 6).

Tab. 6: Vergleich von PCS Messungen bei 11.1°. Es wurden jeweils dreifach Bestimmungen der Probe A (HDH) vor der Homogenisation und Probe I (HDH) nach der Hochdruckhomogenisation durchgeführt. Probe I* (HDH) wurde zusätzlich noch konsekutiv durch 5 µm, 0.45 µm und 0.1 µm Filter filtriert.

Probe	Winkel / °	mittlerer Durchmesser / nm	Standardabweichung / nm
A (HDH)	11.1	1773.3 / 2055.2 / 2027.8	- / - / -
I (HDH)	11.1	1346.7 / 1385.6 / 1404.6	- / - / -
I* (HDH)	11.1	247.2 / 301.8 / 266.5	breit / breit / breit

Durch Entfernen der größeren Partikel durch Filtration sinkt der mittlere Partikeldurchmesser ca. um den Faktor 5. Somit zeigt sich, dass auch nach der Homogenisation noch vereinzelt größere Partikel anwesend sind, die zu einem systematischen Fehler in der Messung bei kleinen Streuwinkeln führen. Deshalb wurden alle Messungen mit einem Streuwinkel von 90° durchgeführt.

Tab. 7: Vergleich von PCS Messungen bei 90°. Es wurden jeweils dreifach Bestimmungen der Probe A (HDH/USS) vor der Homogenisation, Probe I (HDH) nach der Hochdruckhomogenisation, Probe J (USS) nach der Ultraschallsondenhomogenisation und der Probe J (USB) nach der Ultraschallbadhomogenisation durchgeführt.

Probe	Winkel / °	mittlerer Durchmesser / nm	Standardabweichung / nm
A (HDH)	90	552.6 / 428.6 / 453.3	breit / breit / breit
A (USS)	90	534.2 / 517.2 / 533.2	breit / breit / breit
I (HDH)	90	114.2 / 118.5 / 114.3	breit / 36.81 / breit
J (USS)	90	93 / 89.9 / 99.6	breit / breit / 25.94
J (USB)	90	418.4 / 415.0 / 605.2	157.64 / 156.61 / breit

Die Messwerte unter einem Streuwinkel von 90° zeigen für unbehandelte BR Proben A (HDH/USS) einen mittleren Durchmesser von ca. 500 nm. Für die Probe I (HDH) nach Hochdruckhomogenisation wurde ein Partikeldurchmesser von 116 nm bzw. für die Probe J (USS) nach Behandlung mit Ultraschallsonde von 94 nm gemessen. Somit liegen die Ergebnisse im Einklang mit den Filtrationsergebnissen. Es zeigt sich weiterhin, dass das Ultraschallbad zur Homogenisierung nicht geeignet ist, da keine merkliche Teilchengrößenreduzierung eintritt.

Somit zeigt sich, dass die Hochdruckhomogenisation und die Behandlung mit der Ultraschallsonde geeignete Methoden zur Zerkleinerung bzw. Homogenisierung von PM-Suspensionen darstellen. Das Ultraschallsondenverfahren ermöglicht gegenüber der Hochdruckhomogenisation, die eine Mindestviskosität der Probe entsprechend $OD \geq 20$ verlangt, auch die Homogenisierung von Proben geringer Viskosität und damit niedrigerer OD. Ein weiterer Vorteil der Homogenisierung mittels Ultraschallsonde besteht gegenüber der Hochdruckhomogenisation, bei der das Volumen durch die Druckkammer vorgegeben ist, in dem frei wählbaren Probenvolumen. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde deshalb, auch wegen des geringeren Zeitaufwandes, die Homogenisation mittels Ultraschallsonde der Hochdruckhomogenisation vorgezogen.

Neben der Homogenisation muss eine Methode zur Langzeitlagerung der homogenisierten Purpurnembran ohne merkliche Reaggregation zur Verfügung stehen. Da eine Langzeitlagerung von homogenisierten Proben im Kühlschrank aufgrund der hohen Biokontaminationsgefahr nicht praktikabel ist, bleiben als Lagermöglichkeit nur die Gefriertrocknung bzw. Lagerung als gefrorene Suspension übrig. Um die Auswirkungen der Lagertechniken auf die Teilchengröße zu testen wurden die Proben wie zuvor beschrieben mit Hilfe der Ultraschallsonde homogenisiert und anschließend vor und nach der Lagerung vermessen. Um Aggregate mit schwacher WW aufzulösen wurden die Proben unmittelbar vor

der Messung für 5 min im US-Bad suspendiert. Wie bereits zuvor gezeigt wurde, reicht hierbei die Energie nicht aus, um die tatsächliche Teilchengröße merklich zu verändern.

Eine mit der Ultraschallsonde homogenisierte Probe Y (USS) die einem Frier- / Tauprozess (24 h Tiefkühlschrank) unterworfen wurde, zeigte eine deutliche Abnahme der OD während der konsekutiven Filterung (siehe Abb. 18). Es ist also von einer Rekonstitution bzw. Reaggregation der Patches auszugehen. Die Probe Z (USS) die gefriergetrocknet und anschließend resuspendiert wurde, zeigte keine deutliche Abnahme der OD während der konsekutiven Filterung.

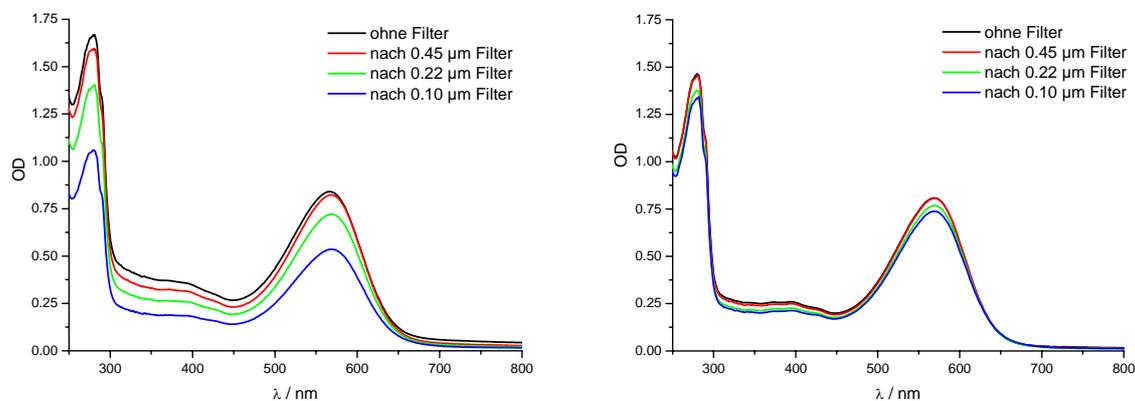


Abb. 18: UV/vis-spektroskopische Verfolgung der OD-Änderung einer in konsekutiven Schritten durch Filter mit abnehmender Porengröße gefilterten PM-Suspension. Links: Homogenisierte Probe Y (USS) nach Ultraschallsondenhomogenisation und Frier-/Tauzyklus. Rechts: Homogenisierte Probe Z (USS) nach Ultraschallsondenhomogenisation und Gefrier-trocknung/Resuspension.

Auch die Proben aus den Lagerversuchen werden mittels der Photonenkorrelations-spektroskopie bei einem Streuwinkel von 90° untersucht.

Tab. 8: Vergleich von PCS Messungen bei 90° . Es wurden jeweils dreifach Bestimmungen der Probe X (USS) nach der Ultraschallsondenhomogenisation, Probe Y (USS) nach Ultraschallsondenhomogenisation und Frier-/Tauzyklus und Probe Z (USS) nach Ultraschallsondenhomogenisation und Gefrier-trocknung/Resuspension.

Probe	Winkel / $^\circ$	mittlerer Durchmesser / nm	Standardabweichung / nm
X (USS)	90	83.2 / 86.0 / 81.5	breit / 30.35 / breit
Y(USS)	90	231.8 / 225.0 / 227.5	86.74 / breit / breit
Z (USS)	90	121.7 / 119.6 / 120.7	breit / breit / breit

Ein Vergleich der spektroskopischen Filtrationsuntersuchungen mit den Ergebnissen aus der PCS zeigt, dass die Ergebnisse aus beiden Messmethoden kongruent sind. Die gefrorene Probe zeigt eine drastische Erhöhung des mittleren Teilchendurchmessers, wohingegen der

Teilchendurchmesser der gefriergetrockneten Probe weitgehend dem der Probe X (USS) direkt nach der Ultraschallsondenhomogenisation entspricht. Die mit Hilfe der Ultraschallsonde homogenisierten Suspensionen können also erfolgreich ohne starke Zunahme der mittleren Teilchengröße gefriergetrocknet und erneut in Wasser aufgenommen werden.

4.4 Zusammenfassung

Die Grundlage für die Erschließung neuer Applikationen oder Integration in bestehende Anwendungsbereiche stellen die physiko-chemischen Eigenschaften der PM dar. In diesem Abschnitt wurden die für diese Arbeit technisch relevantesten Eigenschaften charakterisiert. Durch das hier vorgestellte Konzept der Löslichkeitsparameter können Voraussagen über geeignete, also für BR verträgliche, Lösungsmittel und polymere Matrixmaterialien gemacht werden. Bezüglich der Temperaturtoleranz bleibt die Funktion des Proteins bis 80 °C in Suspension und bis 140 °C im lyophilisiertem Zustand bzw. in trockenen Polymerschichten erhalten. Im Rahmen einer Applikationsentwicklung kann somit das Screening durch geeignete Vorauswahl der Komponenten und Prozessierverfahren minimiert werden. Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen zur Teilchengrößeneinstellung wurden mit der Ultraschallsonden- und der Hochdruckhomogenisation zwei Verfahren entwickelt, die zur Teilchengrößeneinstellung bzw. Homogenisation von Purpurmembranfragmenten geeignet sind. Weiterhin wurde mit der Photonenkorrelationsspektroskopie eine Messmethode zur Quantifizierung der mittleren Teilchengröße von PM-Patches etabliert. Die mittlere Teilchengröße der Patches in den homogenisierten Proben wurde mit ca. 100 nm bestimmt. Zur Langzeitlagerung des homogenisierten Materials ohne Reaggregation stellte sich die Gefriertrocknung als geeignet dar. Somit liegt eine Methode vor, mit der die stark variierende polymodale Größenverteilung der PM-Fragmente in eine homogene monomodale überführt werden kann. Somit kann ein definiertes reproduzierbares physiko-chemisches Verhalten bezüglich rheologischer, Sedimentation- und Lichtstreuungseigenschaften von BR gewährleistet werden. Dies ist eine weitere wichtige Grundlage für die Integration von BR in bestehende Prozesse oder die Erschließung neuer Applikationen.

5 BR als multifunktionales Sicherheitselement

5.1 Einleitung

Die Fälschungssicherheit von Dokumenten (Identity-Cards, Banknoten, etc.) und Produkten (Markenartikel, Medikamente etc.) ist von hohem ökonomischen und politischen Interesse. So wird der wirtschaftliche Schaden durch die Imitation von Markenartikeln auf ca. 250 Milliarden US\$ pro Jahr geschätzt ^[84]. Die Sicherung von Dokumenten und Produkten erfolgt oft durch verschiedenste optische Elemente ^[85], die manuell-optisch oder optoelektronisch abgemustert und so auf ihre Authentizität überprüft werden können. Zur Erhöhung der Fälschungssicherheit werden oft diverse Sicherheitselemente kombiniert. Ein aktuelles Beispiel hierfür stellen die Anfang 2001 eingeführten Euro-Banknoten dar. Sie verfügen über eine Vielzahl aktueller optischer Sicherheitsmerkmale, wie Wasserzeichen, Durchsichtsregister, Sicherheitsfaden mit Mikroschrift, optisch-variable Farbe (Perlglanzstreifen bzw. Kippwertzeichen), Mehrfarbenfluoreszenzdruck, lichtbeugende Folie (Kinegramm[®]) und Hologrammfolie. Allerdings hat der als "sicherste Währung der Welt" geltende Euro ein Sicherheitsproblem. So erhöhte sich die Zahl der im gesamten Euro-Raum aus dem Verkehr gezogenen und begutachteten Euro-Fälschungen im zweiten Halbjahr 2003 gegenüber der ersten Jahreshälfte um 30 Prozent (siehe Tab. 9).

Tab. 9: Euro-Falschgeldaufkommen bestimmt nach aus dem Verkehr gezogenen und begutachteten Falschgeldnoten ^[86].

	Stück 2002		Stück 2003	
	1. Halbjahr	2. Halbjahr	1. Halbjahr	2. Halbjahr
5 €	k. A.	730	844	2,365
10 €	k. A.	1,898	2,543	2,792
20 €	k. A.	11,522	54,285	95,233
50 €	k. A.	121,826	152,072	162,744
100 €	k. A.	8,046	14,839	39,736
200 €	k. A.	1,007	5,5162	8,510
500 €	k. A.	124	435	515
Gesamtzahl	21,695	145,153	230,534	311,925
Gesamtwert / €	k. A.	7,412,370	10,546,420	16,016,205

Die Fälscher ahmen mittlerweile alle für den Verbraucher erkennbaren Sicherheitsmerkmale der Euronoten nach und berücksichtigen dabei auch die gängigen Prüfmethode an den Ladenkassen. Die Noten werden dabei in einer so hervorragenden Qualität nachgemacht, dass

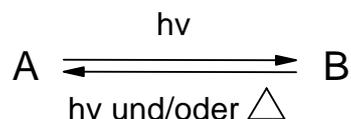
sie immer öfter selbst die maschinellen Kontrollen der Geschäftsbanken unbeanstandet passieren und erst bei der Bundesbank oder deren Zweiganstalten entdeckt werden ^[86]. Es wird deutlich, dass u.a. durch die Verfügbarkeit hochwertiger Farbkopierer, Scanner, Drucker und Prägepressen die klassischen Sicherheitsmerkmale nur noch bedingt zum Schutz von Dokumenten und Produkten geeignet sind.

Es wird also deutlich, dass neue innovative Sicherheitselemente benötigt werden. Im Rahmen dieser Arbeit soll der Einsatz von Bakteriorhodopsin als Pigment in einer Sicherheitsdruckfarbe geprüft werden. Hierbei sollen die Konzepte von Bakteriorhodopsin als photochromes Pigment und als optischer Langzeitdatenspeicher evaluiert werden und zu einem multifunktionalen Sicherheitskonzept auf Basis von Bakteriorhodopsin vereint werden.

5.2 BR als photochromes Sicherheitselement

5.2.1 Einleitung

Photochrome Materialien zeigen bei Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlängenzusammensetzung einen reversiblen Farbwechsel. Abhängig von der Strahlungsintensität kann der Farbwechsel innerhalb von Sekundenbruchteilen oder mehreren Sekunden stattfinden. Entfernt man die Strahlungsquelle kehren die Photochrome im Allgemeinen durch thermische Relaxation innerhalb von Sekunden bis Minuten zur Ausgangsfarbe zurück. Dieser Relaxationsprozess kann durch Bestrahlung mit geeignetem Licht beschleunigt werden.



Die klassischen photochromen Materialien leiten sich aus den Verbindungsklassen der Fulgide und Spiroverbindungen ^[87] ab. Die stabilsten Fulgide, Handelsname Aberchrome, ermöglichen ca. 8,000 Schaltzyklen ohne erkennbare Degradation ^[88]. Eine neue Klasse photochromer Farbstoffe mit Schaltzyklen von ca. 30,000 Schaltzyklen wurde von Irie et al. ^[89] auf Basis von Diarylethenverbindungen entwickelt.

Obwohl bereits kommerzielle Sicherheitsdruckfarben z. B. durch SICPA ^[90] auf Basis synthetischer Photochrome angeboten werden, ist ihre Verwendung als Sicherheitselement,

als so genanntes "noniridescent optically variable device" (OVD) ^[85], stark limitiert, da diese Verbindungen aufgrund ihrer hohen Reaktivität zur thermischen und photochemischen Degradation neigen, somit keine Langzeitfunktionalität zeigen und zumeist nur mit UV oder UV nahem Licht schaltbar sind.

Das Photochrom Bakteriorhodopsin zeigt hingegen auch bei $\geq 1,000,000$ Schaltzyklen keine merkliche Degradation ^[91], verfügt für ein proteinbasiertes Pigment über eine ausgezeichnete physiko-chemische Stabilität (siehe Kapitel 4) und lässt sich mit Licht im sichtbaren Bereich schalten.

Das in *Halobacterium salinarum* natürlich vorkommende Wildtyp-Bakteriorhodopsin ist durch seine kurze Lebensdauer des M₄₁₀ Intermediates nur bedingt für den Einsatz als Photochrom geeignet. So ist es notwendig den Photozyklus des BR der Applikationsanwendung entsprechend anzupassen. Dies kann durch gentechnische Methoden erreicht werden ^[92].

5.2.1.1 Gentechnische Modifikationen von Bakteriorhodopsin

Die Erhöhung der Population des M₄₁₀ Intermediats kann durch Modifikation im thermischen Übergang vom Intermediat M₄₁₀ nach N₅₆₀ erfolgen. In diesem Schritt erfolgt die Reprotonierung der Schiffischen Base vom Protonendonator Asparaginsäure-96. Durch Austausch der Asparaginsäure-96 gegen Asparagin, kann die Reprotonierung nur direkt von der zytoplasmatischen Seite erfolgen, was mit einer Verlängerung der Lebensdauer des M Intermediats einhergeht ^[92]. Diese Mutante wird als D96N bezeichnet. Durch diese gentechnische Modifikation lässt sich ein vereinfachter Photozyklus postulieren:

5.2.1.2 Vereinfachter Photozyklus

Das M₄₁₀ Intermediat, das durch ein stark hypsochrom verschobenes Absorptionsmaximum gekennzeichnet ist, verfügt durch die vorgenommene Mutation im Vergleich zu den übrigen Intermediaten über eine extrem hohe Lebensdauer. Im Verlauf des Photozyklus tritt also eine erhöhte Akkumulation dieses Intermediats auf. Somit kann die Population der restlichen Intermediate vernachlässigt werden und ein idealisiertes Zweizustandsmodell aus dem Ausgangszustand B₅₇₀ und dem Intermediat M₄₁₀ formuliert werden. Der sich daraus

ergebende vereinfachte Photozyklus ist in Abb. 19 dargestellt und zeigt die möglichen thermischen und photochemischen Übergänge.

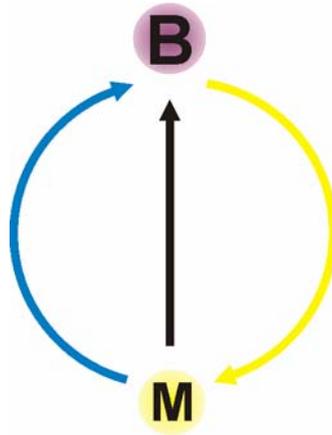


Abb. 19: Vereinfachter Photozyklus von Bakteriorhodopsin. Die farbigen Pfeile symbolisieren die photochemischen Übergänge und der schwarze Pfeil den thermischen Übergang.

Das Absorptionsmaximum von B_{570} liegt mit $\lambda = 570$ nm im gelben Bereich des sichtbaren Spektrums und wird vom Betrachter als komplementäre Farbe Lila wahrgenommen. Für das Intermediat M_{410} ergibt sich ein gelber Farbton. Durch Einstrahlung in die Absorptionsmaxima der Zustände, hierfür reichen breitbandige farbige Lichtquellen aus, ist es möglich zwischen den Zuständen zu schalten. Unter Belichtung mit breitbandigen kontinuierlichen Lichtquellen stellt sich ein Gleichgewicht zwischen den beiden Zuständen ein, das vom Betrachter als Mischfarbe aus Lila und Gelb wahrgenommen wird.

5.2.2 Entwicklung einer Tampondruckfarbe

Zur Erschließung des Potentials von BR in Sicherheitsapplikationen soll eine Druckfarbe entwickelt werden, die es ermöglicht photochrome OVDs in Schrift- und Bildform auf Bedruckstoffe aufzubringen. Druckfarben werden nach dem Druckverfahren, für das sie eingesetzt werden sollen klassifiziert. Ein entscheidendes Auswahlkriterium bezüglich des zu verwendenden Druckverfahrens stellt die in einem Druckvorgang erreichbare Farbstärke dar. Die Farbstärke kann vereinfachend mit der optischen Dichte des Drucks in Reflektion gleichgesetzt werden. Sie ergibt sich für einen Pigmenttyp aus der Nassschichtdicke des Drucks und dem Pigmentierungsgrad der Druckfarbe. Zur Kalkulation wurde der Pigmentierungsgrad für die verschiedenen Druckfarben aus bisherigen rheologischen

Untersuchungen an PM und aus Standardrezepturierungen kommerzieller Druckfarben abgeschätzt.

Tab. 10: Abschätzung der OD in Reflexion für PM basierende Druckfarben ^[53] (siehe Kapitel 5.2.3.1).

Druckverfahren	Nassschichtdicke	Pigmentierung	OD bei 570 nm
Flexodruck (Hochdruck)	2-4 μm	10-15 % (m/m)	0.1 - 0.2
Offset (Flachdruck)	1-2 μm	30-40 % (m/m)	0.1 - 0.3
Tampondruck (Tiefdruck)	20-40 μm	10-15 % (m/m)	0.7 - 2.1
Siebdruck (Durchdruck)	10-60 μm	10-15 % (m/m)	0.4 - 3.2

Ein OVD sollte eine OD > 0.5 haben, um eine einfache visuelle Abmusterbarkeit zu gewährleisten. Demzufolge eignen sich nur Tampon- und Siebdruck als mechanische Druckverfahren zur Erzeugung auf BR basierender OVDs. Eine Siebdruckfarbe wurde bereits zuvor in der Arbeitsgruppe Hampp entwickelt ^[52]. Ziel dieser Arbeit ist es, basierend auf der BR-Mutante D96N eine photochrome Tampondruckfarbe zu entwickeln und zu evaluieren.

Der Tampondruck ist ein indirektes Tiefdruckverfahren, bei der über ein druckbildübertragendes Zwischenelement, der Tampon, das Druckbild von der Druckform, dem Tiefdruckklischee, auf das Druckgut überträgt ^[93]. Die Abb. 20 zeigt die Funktionsweise einer 1-Farben-Tampondruckmaschine mit geschlossenem Farbsystem, wie sie im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde (siehe Kapitel 3.2.3). Für den Druckvorgang wird der Tampon auf das zuvor eingefärbte Klischee abgesenkt, wobei der Tampon aufgrund seiner Elastizität das Druckbild auf dem Klischee bedeckt und das Druckbild vom Klischee abnimmt. Nach dem Abheben des Tampons wird dieser über den zu bedruckenden Gegenstand geführt und auf diesen abgesenkt, wobei sich der elastische Tampon dem Werkstück anpasst und das Druckbild auf das Druckgut überträgt. Gleichzeitig gleitet das Klischee unter dem Farbtopf entlang und die Druckform wird erneut eingefärbt. Während der Rückführung des Tampons in die Ruhestellung, wird das Klischee wieder unter den Tampon geführt und gleichzeitig die Druckform durch den Rakelring abgerakelt, so dass sich nur noch an den Bildstellen, in den Vertiefungen des Klischees, Farbe befindet. Nun wiederholt sich der gesamte Vorgang, wobei das Werkstück gewechselt wird oder, wenn eine besonders kräftige Einfärbung gewünscht wird, für einen zweiten Druckvorgang in seiner Position bleibt.

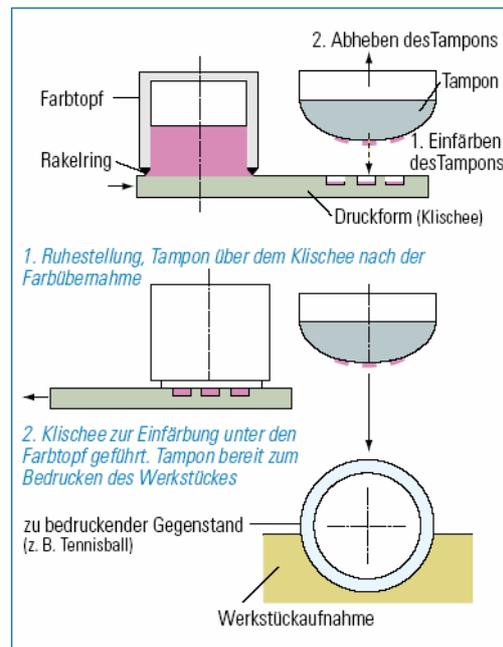


Abb. 20: Prinzipskizze des Tampondrucks mit geschlossenem System zur Einfärbung des Klischees.

Der Tampondruck eignet sich aufgrund seines elastischen druckbildübertragenden Zwischenelements sowohl für flache Gegenstände, als auch zum Bedrucken von nahezu beliebig geformten Oberflächen (Körperdruck).

5.2.2.1 Anforderungsprofil der photochromen Tampondruckfarbe

Druckfarben setzen sich im Wesentlichen aus Farbmitteln (Pigmente, Farbstoffe), Bindemitteln und Additiven zusammen. Die Zusammensetzung von Tampondruckfarben entspricht weitgehend den Siebdruckfarben [53, 93, 94], da sie eine historische Weiterentwicklung der Siebdruckfarben darstellen. Im Allgemeinen sind die Tampondruckfarben allerdings aufgrund der geringeren Schichtdicke des Druckbilds höher pigmentiert. Ähnlich dem Siebdruck, kann mittels Tampondruck eine breite Palette von Materialien wie Papier, Pappe, Karton, Holz, Gummi, Kunststoff, Leder, Kunstleder, Glas und Porzellan, sowie lackierte Flächen bedruckt werden, wobei entsprechend dem jeweiligen Bedruckstoff verschiedene Spezialfarben notwendig sind. Die im Rahmen dieser Arbeit zu entwickelnde Druckfarbe soll bevorzugt zur Dokumentsicherung auf Papier und Karton aufgebracht werden.

Weiterhin muss die Farbe so beschaffen sein, dass sie trotz der geringen Benetzbarkeit des silikonhaltigen Tamponmaterials beim Abheben des Tampons vom Klischee vollständig auf

dessen Oberfläche haften bleibt. Dies kann im Allgemeinen durch Zusatz eines Netzmittels zur Druckfarbe erfolgen. Im Rahmen der Entwicklung sind also verschiedene Netzmittel bezüglich ihrer Matrixkompatibilität zu BR (siehe Kapitel 4.1) und Verbesserung der Benetzbarkeit auf Silikonoberflächen zu testen.

Für den Übertrag vom Tampon benötigt die Druckfarbe eine Haftung gegenüber dem Bedruckstoff. Diese, auch als Zügigkeit (Tack) bezeichnete Eigenschaft der Farbe, wird bei Tampondruckfarben durch Zusatz von leichtflüchtigen Lösemitteln, auch als Beschleuniger bezeichnet, erreicht. Über den Zusatz an Trocknungsverzögerer oder -beschleuniger wird die Trocknung an die Druckgeschwindigkeit so angepasst, dass die Haftung auf der zu bedruckenden Fläche deutlich höher als die am Tampon ist. Die Photochromie des BR ist wie bereits eingangs dargestellt (siehe Kapitel 2.4) an einen intra- und extramembranen Protonentransport gekoppelt. Da sich die Gewährleistung des extramembranen Protonentransports in nichtwasserhaltigen Bindemitteln als schwierig darstellt, soll eine wasserbasierte Druckfarbe auf Basis eines wassergängigen Bindemittel entwickelt werden. Auf den Zusatz von Beschleunigern soll zugunsten einer erhöhten Matrixstabilität (siehe Kapitel 4.1) verzichtet werden. Die Zügigkeit der Farbe soll allein über das Bindemittel gewährleistet werden.

Von besonderem Interesse ist die Kinetik des photochromen Farbwechsels. Der Farbwechsel sollte für das Auge gut sichtbar innerhalb weniger Sekunden erfolgen. Die Empfindlichkeit der Drucke ist hierbei so einzustellen, dass der Farbwechsel mit handelsüblichen Lichtquellen hervorgerufen werden kann. In vorangehenden Arbeiten zur Untersuchung photochromer BR-Filme wurde monochromatische Laserstrahlung verwendet ^[95]. In dieser Arbeit wurden bewusst polychromatische ubiquitäre Strahlungsquellen, wie Glüh-, Halogen- und Leuchtstofflampen (siehe Abb. 28), verwendet, um das photochrome Verhalten der entwickelten OVDs möglichst realitätsnah zu quantifizieren. Um diese Anforderungen an das photochrome Verhalten der Drucke zu erfüllen, muss die Lebensdauer von M₄₁₀ zusätzlich zur Mutation D96N (siehe Kapitel 5.2.1.1) durch Zusatz geeigneter Additive in der Druckfarbe verlängert werden.

Die Lichtechtheit, also die Beständigkeit der Farbe gegen Ausbleichen durch die Einwirkung von Licht, der zu entwickelnden Farbe soll mindestens auf dem Niveau anderer Sicherheitsdruckfarben, wie z.B. den Leuchtdruckfarben, liegen.

Die „Konsistenz“, also das Fließverhalten, und damit die Viskosität der Druckfarbe haben einen entscheidenden Einfluss auf das Druckverhalten der Farbe. Das Fließverhalten der zu entwickelnden Farbe soll an das einer kommerziellen Tampondruckfarbe adaptiert werden.

Tab. 11: Anforderungsprofil für eine photochrome Tampondruckfarbe auf BR Basis.

Komponente/Eigenschaft	Anforderungsprofil
Bedruckstoff	Papier und Karton
Bindemittel	wassergängiger Polymer mit ausreichender Zügigkeit
Lösungsmittel	wasserbasierte Druckfarbe, keine Beschleuniger
Additive	matrixkompatibles, wassergängiges Netzmittel
Photochromie	Einstellung über geeignete Additive
Lichtechtheit	gleich oder besser Leuchtdruckfarben
Fließverhalten	Adaption an kommerzielle Tampondruckfarbe

5.2.2.2 Auswahl der Komponenten und Charakterisierung der Druckfarbe

Die Auswahl des richtigen Tampons ist für eine optimale Übertragung des Druckbildes auf den Bedruckstoff essentiell. Die Form des Tampons sollte der zu bedruckenden Oberflächenform angepasst werden. Für den Flächendruck wurde ein relativ flacher Tampon mit leicht angestelltem Profil gewählt, um Lufteinschlüsse und ein Schieben (Verzerrung) des Druckbildes beim Druck zu verhindern ^[94].

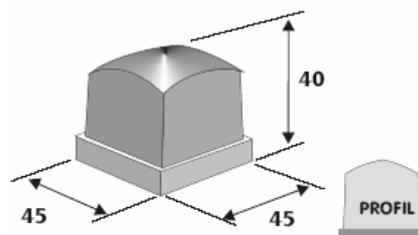


Abb. 21: Profil des verwendeten Tampons Profiltyp 405 (Tampoflex, Ditzingen)

Weiterhin wird die Härte der Tampons, die aus kaltvulkanisierendem Silikonkautschuk gefertigt werden, über den Silikonölgehalt des Kautschuks gesteuert. Die Härte der Tampons wird im Allgemeinen in Shore A angegeben und reicht von 0 Shore A bis 12 Shore A für gängige kommerziell erhältliche Tampons. Wobei der Silikonölgehalt mit steigender Shore A abnimmt und damit die Härte des Tampons ansteigt. Generell zeigen Tampons mit einem geringen Ölgehalt ein besseres Pastenübertragungsverhalten, da hier eine bessere Benetzbarkeit des Tampons vorhanden ist, die sich positiv auf die Übertragung des

Druckbildes auf den und von dem Tampon auswirkt. Allerdings benötigt der Tampon aufgrund des gewählten Profils eine Deformationsfähigkeit, also eine geringe Härte, um sich dem flachen Bedruckstoff anzupassen. In Vorversuchen zeigte sich, dass eine mittlere Tamponhärte von 4-6 Shore A einen idealen Kompromiss darstellt. In allen folgenden Experimenten wurde ein Tampon vom Typ 203 405 (Tamponflex, Ditzingen) verwendet.

Wie zuvor erörtert (siehe Kapitel 5.2.2.1) soll eine wasserbasierte Tampondruckfarbe entwickelt werden. Um eine fehlerfreie Übertragung des Druckbildes zu gewährleisten, muss der Druckfarbe ein geeignetes Netzmittel zugesetzt werden, das den niedrigen Benetzungsgrad der Druckfarbe auf dem Tampon erhöht. In Vorversuchen wurden mehrere wassergängige Netzmittel bezüglich ihrer Matrixkompatibilität zu BR (siehe Kapitel 4.1) evaluiert. Hierbei zeigte sich, dass im Besonderen Netzmittel mit ionischem Charakter^[96], also stark hydrophiler Gruppen, zu einer Degradation der Lipidschicht der PM und damit zu einer Destabilisierung des BR führen. Die nichtionogenen Netzmittel auf Polymerbasis (Borchi Gen 12, Borchi Gen DFN und SF 1188 A) zeigten hingegen eine gute Matrixkompatibilität zu BR und auch in hohen Konzentrationen (15 % (v/v in H₂O)) keine Degradation des BR.

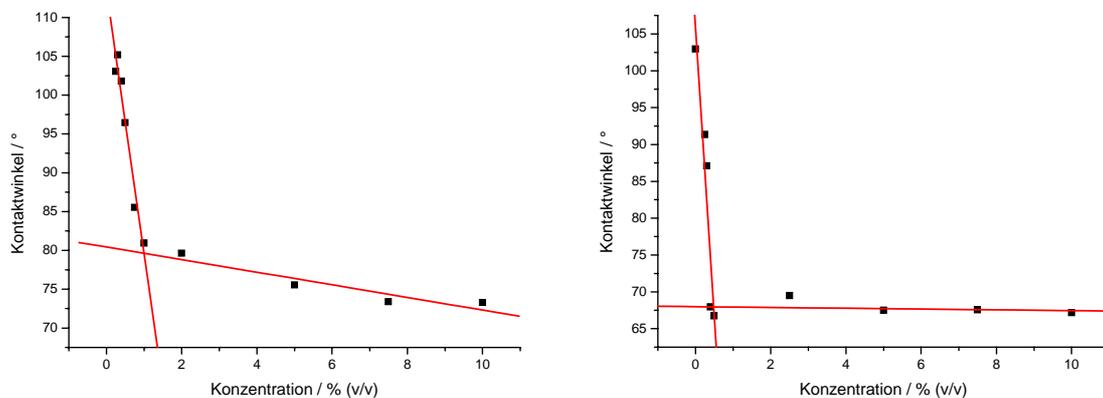


Abb. 22: Kontaktwinkelmessungen zur Benetzbarkeit des Tampons als Funktion der Netzmittelkonzentration. Links: Netzmittel Borchi Gen 12 (Borchers, Monheim). Rechts: Netzmittel Borchi Gen DFN (Borchers, Monheim).

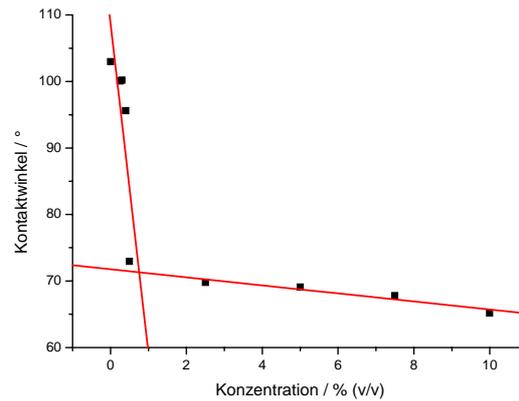


Abb. 23: Kontaktwinkelmessungen zur Benetzbarkeit des Tampons als Funktion der Netzmittelkonzentration. Netzmittel: SF 1188A (GE Bayer Silicones, Bergen op Zoom, Niederlande).

Die als matrixkompatibel zu BR identifizierten Netzmittel wurden auf ihr Vermögen zur Verbesserung der Benetzbarkeit einer Tamponoberfläche aus Silikonkautschuk hin untersucht. Hierzu wurden wässrige Lösungen verschiedener Netzmittelkonzentration bezüglich ihrer Grenzflächenspannung mittels Kontaktwinkelmessung (siehe Kapitel 3.3.1) untersucht.

Tab. 12: Benetzbarkeit einer Oberfläche als Funktion des Kontaktwinkels.

$\theta = 0^\circ$	Flüssigkeit spreitet auf der Oberfläche (vollständige Benetzung)
$0^\circ \leq \theta \leq 90^\circ / \sigma_{SG} - \sigma_{LS} > 0$	die Flüssigkeit benetzt die Oberfläche, spreitet aber nicht (unvollständige Benetzung)
$90^\circ \leq \theta \leq 180^\circ / \sigma_{SG} - \sigma_{LS} < 0$	keine Spreitung und auch Benetzung erfolgt nicht bzw. nur sehr unvollständig
$\theta = 180^\circ$	absolute Unbenetzbarkeit

Eine Tampondruckfarbe sollte für ein optimales Pastenübertragungsverhalten die Oberfläche des Tampons benetzen, aber nicht vollständig auf dem Tampon spreiten, da eine Spreitung zu einer Minderung des Auflösungsvermögen des Druckbildes führt. Der Kontaktwinkel sollte somit zwischen 0° und 90° liegen (siehe Tab. 1).

Deutlich ist in den Messungen (siehe Abb. 23) die sprunghafte Änderung des Verhaltens des Kontaktwinkels als Funktion der Netzmittelkonzentration bei Erreichen der kritischen Micellbildungskonzentration (KMK) zu erkennen. Nach Überschreiten der KMK bilden die Tensidmoleküle durch Aggregation oberflächeninaktive Micellen und die Konzentration der oberflächenaktiven Tensidmoleküle und somit der Kontaktwinkel bleibt praktisch konstant.

Der Kontaktwinkel für Netzmittelkonzentrationen $> 1 \%$ (v/v in H_2O) liegt bei ca. 70° bis 75° und somit im gewünschten Bereich. Neben der Verbesserung der Benetzbarkeit der Tamponoberfläche wird ein Netzmittel in pigmentierten Druckfarben auch als Dispergierhilfsmittel eingesetzt, um eine Sedimentation oder eine Aggregation der Pigmente zu verhindern. Denn Pigmente innerhalb einer Druckfarbe neigen generell zur Anlagerung von Tensiden an ihrer Oberflächen, so dass Netzmittel grundsätzlich oberhalb ihrer KMK der Druckfarbe zu gesetzt werden. Üblicherweise liegen die Zugabemengen bei 3% bis 8% (m/m) Netzmittel bezogen auf die Druckfarbe ^[97]. Während der Andruckversuche zeigte sich in Kombination mit dem gewählten Polymer für das Netzmittel SF 1188A das beste Pastenübertragungsverhalten und die größte Langzeitstabilität der Drucke und Druckfarben.

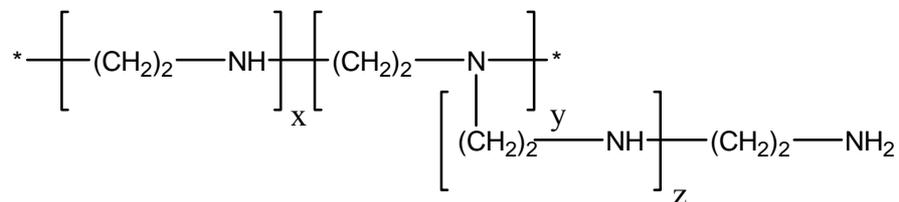


Abb. 24: Allgemeine Strukturformel für Polyethylenimin.

Für die Vorauswahl der Bindemittel ergeben sich folgende Anforderungen: Wasserlöslichkeit, gute Filmbildungstendenz, gute Zügigkeit und Matrixkompatibilität zu BR. In Vorversuchen zeigte ein hochmolekulares Polyethylenimin (PEI) (M_w 750, 000, M_n 60,000, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) gute Bindemittleigenschaften. Polyethylenimine verfügen durch ihren hohen Anteil an primären, sekundären und tertiären Amino-Gruppen über polybasische Eigenschaften (siehe Abb. 24). Durch Aufnahme von Protonen aus dem umgebenden Medium bilden sie Polykationen, und sind somit befähigt durch elektrostatische Wechselwirkung um anionische Template eine feste Polyelektrolythülle auszubilden ^[98]. Auch die Purpurmembranfragmente zeigten durch ihre negative Oberflächenladung ^[99] in Vorversuchen eine starke Affinität zum Polyethylenimin. Durch die elektrostatische Wechselwirkung zwischen Pigment und Bindemittel kann ein Ausschwimmen der Pigmente in der Druckschicht während der Filmbildung verhindert werden ^[100]. In der entwickelten Tampondruckfarbe und in allen Vorstufen wurden dementsprechend keine Ausschwimmeffekte oder eine Farbspaltung zwischen Tampon, Paste und Bedruckstoff beobachtet. Weiterhin führt die PEI-Matrix zu einer Erhöhung der M-Lebensdauer des Bakteriorhodopsins, also des gelben Zustandes, in der Druckschicht. Auf die

Charakterisierung und Optimierung der Photochromie der Druckschichten wird gesondert in Kapitel 5.2.3.3 eingegangen.

Basierend auf den ausgewählten Komponenten wurde in einem iterativen Prozess eine Basistampondruckfarbe durch Adaption des rheologischen Verhaltens an eine kommerzielle Referenzfarbe entwickelt. Ausgehend von dieser Basis wurde die Druckfarbe in weiteren iterativen Prozessen bezüglich hoher Pigmentierung, Auflösung, Druckbild und Photochromie optimiert.

Auf den Zusatz von Bioziden zur Unterdrückung von Pilz- und bakteriellem Befall der Druckfarbe wurde verzichtet. Somit ergibt sich für die Druckfarbe nur eine begrenzte Langzeitstabilität. Falls eine erhöhte Langzeitstabilität gegen biologische Degradation gefordert ist, kann der Druckfarbe das Biozid Mergal K9N (Riedel-de Haën, Seelze) in der Konzentration von 0.1 % (m/m) zugesetzt werden.

Tab. 13: Zusammensetzung der entwickelten Tampondruckfarbe.

Funktion	Komponente	%-Anteil (m/m)
Pigment	PM D96N	11.3 %
Bindemittel	PEI	3.6 %
Lösungsmittel	Wasser	78.1 %
Netzmittel	SF1188A	5.3 %
Additive Photochromie	Arginin / Natriumacetat	0.7 % / 1.0 %

Im Folgenden (siehe Abb. 25 und Abb. 26) sind die charakteristischen rheologischen Eigenschaften der entwickelten Druckfarbe im Vergleich zur kommerziellen Referenzfarbe dargestellt (siehe Kapitel 3.3.2).

Deutlich zeigen die Tampondruckfarben in den Untersuchungen zum belastungsabhängigen Fließen (siehe Abb. 25) ein scherverdünnendes Verhalten, oft auch als pseudoplastisch oder strukturviskos bezeichnet. Die Scherviskosität der Farben nimmt also mit steigender Scherbelastung ab. Dieses scherverdünnende Verhalten ist für die Prozessierbarkeit der Farbe essentiell, da sich beim Rakeln im Klischee mit anschließendem Transfer zum Bedruckstoff das Fließverhalten der Druckfarbe von pastös nach flüssig und umgekehrt ändern muss ^[94] (siehe Abb. 20). Neben dem analogen Verhalten unter Scherbelastung, zeigt die entwickelte Druckfarbe eine um den Faktor 2 bis 3 höhere Scherviskosität als die

kommerzielle Druckfarbe. Die höhere Scherviskosität entsteht durch den gewollt hohen Pigmentierungsgrad der entwickelten Druckfarbe und liegt am Limit für die Prozessierbarkeit einer Tampondruckfarbe. Beide Druckfarben verfügen weiterhin über ein thixotropes Fließverhalten, erkennbar an der Hysterese zwischen der mit ansteigender Schergeschwindigkeit gemessenen Gel-Kurve (hohe Viskosität) und der mit abfallender Schergeschwindigkeit gemessenen Sol-Kurve (niedrige Viskosität) [53]. Dieses thixotrope Verhalten begünstigt die Nivellierung der Druckbildraasterung beim Übertrag auf den Bedruckstoff. Die Rasterung entsteht durch das notwendige Stegnetzwerk im Druckklischee, das eine Gleitfläche für die Rakel bildet und damit ein Ausschaulen von Druckfarbe aus den Bildelementen des Klischees durch Eintauchen der Rakel verhindert wird [94, 101].

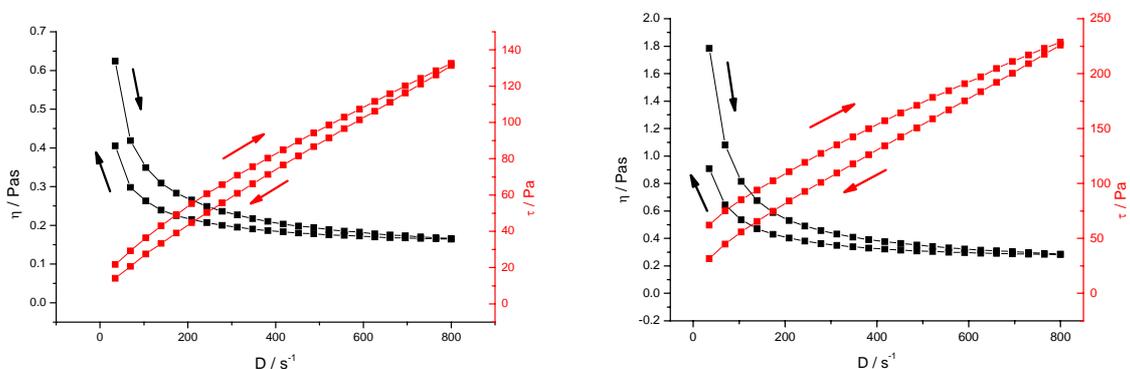


Abb. 25: Rheologische Untersuchungen zum belastungsabhängigen Fließen. Links: Tampondruckfarbe Typ A / Farbton 23 schwarz (Tampoflex, Ditzingen). Rechts: Entwickelte Tampondruckfarbe (siehe Tab. 13). Gemessen wurde bei 20 °C im CSR-Modus.

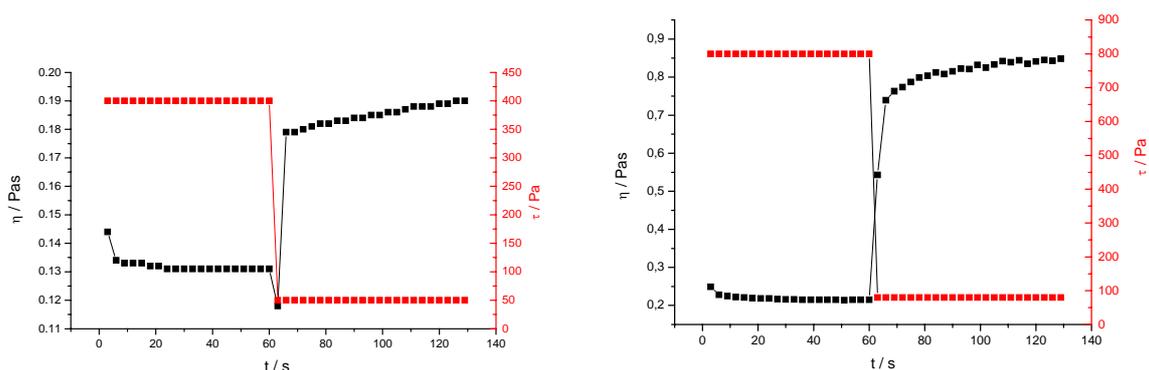


Abb. 26: Rheologische Untersuchungen zum Lastwechselverhalten. Links: Tampondruckfarbe Typ A / Farbton 23 schwarz (Tampoflex, Ditzingen). Rechts: Entwickelte Tampondruckfarbe (siehe Tab. 13). Gemessen wurde bei 20 °C im CSS-Modus.

In den Lastwechselexperimenten (siehe Abb. 26) wird deutlich, dass sich die Scherviskosität der Farben bei einer Änderung der Schubspannung innerhalb sehr kurzer Zeit anpasst. Diese hohe Dynamik des visko-elastischen Verhaltens ist essentiell für eine Tampondruckfarbe, da

der oben beschriebene Pastös-Flüssig-Übergang in einem möglichst kurzen Zeitraum stattfinden muss, um u.a. kurze Verweilzeiten des Tampons auf dem Klischee und dem Bedruckstoff zu gewährleisten und somit hohe Druckfrequenzen zu erreichen^[94].

5.2.3 Charakterisierung der Druckprodukte

5.2.3.1 Optische Dichte der Drucke

Wie bereits zuvor erörtert ist für die Verwendung eines BR-basierenden OVDs eine einfache visuelle Abmusterbarkeit essentiell, hierzu sollte die OD > 0.5 sein. Für die entwickelte Tampondruckfarbe ergibt sich nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz (siehe Kapitel 3.6.1) mit einer Schichtdicke von $d = 23 \mu\text{m}$ (durchschnittliche Ätztiefe der verwendeten Stahlklischees), einem Extinktionskoeffizienten von $\varepsilon = 62700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und 11 % (m/m) PM in der Druckfarbe bei einer Annahme einer Dichte $\rho = 1 \text{ g/cm}^3$ für die Druckfarben ($c(\text{BR}) = 2.8 \text{ mmol/L}$), die maximale optische Dichte des Drucks bei einer Wellenlänge $\lambda = 570 \text{ nm}$ mit OD 0.4 in Transmission bzw. vereinfachend OD 0.8 in Reflexion.

Wird eine höhere OD benötigt, werden klassisch entweder tiefere Klischees mit einer Ätztiefe von $38 \mu\text{m}$ oder mehr^[101] verwendet oder es wird ein Mehrfachdruck ausgeführt. Die OD-Steigerung durch Mehrfachdruck ist durchaus üblich und ist z.B. beim verwendeten Gerät durch eine Doppeldrucktaste vorgesehen. Für die Charakterisierung und Evaluierung der Druckprodukte wurden einfach bis fünffach Drucke verwendet.

5.2.3.2 Auflösungsvermögen der Drucke

Das Auflösungsvermögen bzw. die Feinheit des Druckbildes ist ein entscheidendes Charakteristikum eines Druckverfahrens. Die untere Linienbreite wird beim Tampondruck durch das Klischee vorgegeben. So liegt z. B. die minimale Linienbreite eines Photopolymerklischees bei ca. $15 \mu\text{m}$ ^[94]. Diese Auflösungen werden durch Verbreiterungseffekte während des Farbübertrags auf den und von dem Tampon im Druckbild nicht erreicht. Die untere Grenze der Linienbreite liegt im Druckbild bei ca. $20 \mu\text{m}$ ^[102-105]. Für hochauflösende Drucke wird zumeist der Rotationstampondruck verwendet, da sich hier durch die auf einem Transferzylinder angebrachten Tampons ein gleichmäßigeres Abrollverhalten ergibt^[93, 94]. Das Minimum der Linienbreite für den klassischen Tampondruck liegt bei ca. $50 \mu\text{m}$ im Einfach- und bei ca. $100 \mu\text{m}$ im Mehrfachdruck^[94].

Zur Bestimmung des Auflösungsvermögens der entwickelten Druckfarbe wurden Linien unterschiedlicher Stärke in das Testmuster für Andrucke übernommen (siehe Abb. 27).

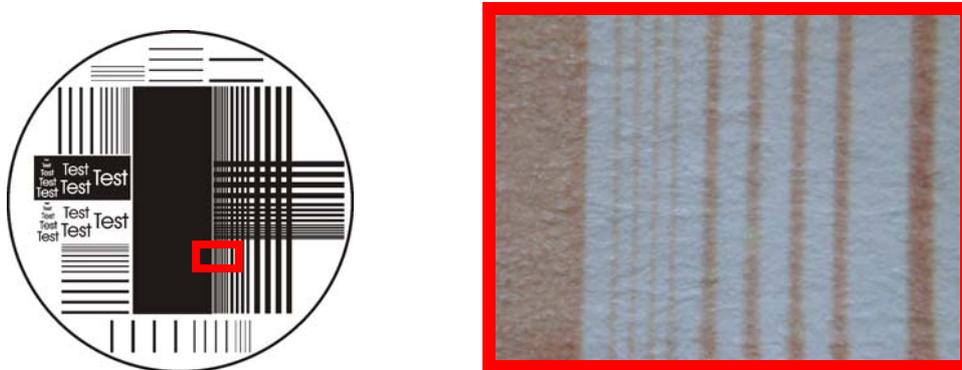


Abb. 27: Bestimmung des Auflösungsvermögens. Links: Reprovorlage des Klischees in Originalgröße, Rechts: Lichtmikroskopische Aufnahme eines fünffach Drucks der BR-Tampondruckfarbe auf Papier.

Die feinsten Linien haben eine Stärke von $80\ \mu\text{m}$ und werden sowohl im Einfach-, als auch im Mehrfachdruck ohne starke Verbreiterung im Druckbild sauber wiedergegeben. Die Linienbreite eines fünffachen Drucks liegt hierfür bei $90\text{-}100\ \mu\text{m}$ (siehe Abb. 27 rechts). Hieraus ergibt sich eine Auflösung von ca. 50 Linienpaaren/cm oder 130 Linienpaaren/inch.

Die erreichte Linienbreite der Druckmuster soll im Folgenden mit dem Auflösungsvermögen des menschlichen Auges verglichen werden. Wird der Sehwinkel zwischen den von zwei Punkten eines Objektes ausgehenden Strahlen kleiner als eine Bogenminute, so vermag die Netzhaut wegen ihrer Struktur die beiden zugehörigen Bildpunkte nicht mehr zu trennen^[106]. Ausgehend von einem Abmusterungsabstand von 25 cm (deutliche Sehweite) verliert das Auge bei einem Abstand von unter $70\ \mu\text{m}$ die Möglichkeit Objekte zu trennen. Die Feinheit des Druckbildes liegt also etwas oberhalb des Auflösungsvermögens des Auges. Für die zu druckenden photochromen OVDs ist eine untere Linienbreite von $90\text{-}100\ \mu\text{m}$ als sehr gut anzusehen.

5.2.3.3 Charakterisierung und Optimierung der Photochromie

Die Photochromie von BR-basierenden Drucken ist eine Funktion verschiedenster Faktoren (siehe Tab. 14). Im Folgenden sollen diese Faktoren kurz unter Nennung der vertiefenden

Literatur diskutiert werden. Weiterhin wird die Vielzahl der Variablen durch Wahl geeigneter Parameter, die durch die technische Applikation als OVD vorgegeben werden, eingeschränkt.

Tab. 14: Einflussfaktoren der Photochromie von BR-basierenden Drucken und gewählte Parameter.

Einflussfaktor	Profil	Parameter
Lichtquelle	fest	Glühlampen, Halogenlampen, (Leuchtstofflampe)
Lichtintensität	fest	700 - 1500 lx [Büro - allgemeine Bürotätigkeit] ^[107]
Temperatur	fest	20 °C [temperierte Raumluf]t
Feuchtigkeit	fest	60 % rLF [klimatisierte Raumluf]t
Protonenverfügbarkeit	fest fest fest variabel	Mutante D96N Bindemittel Polyethylenimin Bedruckstoff Papier, (Glossy) Additive: Arginin & Acetat

Ausgehend vom vereinfachten Photozyklus (siehe Kapitel 5.2.1.2) lässt sich die Photochromie in verschiedene Prozesse zerlegen (siehe Tab. 15):

Tab. 15: Teilprozesse der Photochromie ausgehend vom vereinfachten Photozyklus.

Übergang	Art	kinetische Parameter ^[95]	statische Parameter
$B_{570} \rightarrow M_{410}$	photoinduziert	$B_{\text{decay PI}}, M_{\text{rise PI}}$	Ausgangs- & Endfarbe im dynamischen Gleichgewicht
$M_{410} \rightarrow B_{570}$	(photoinduziert)	$M_{\text{decay PI}}, B_{\text{recovery PI}}$	
$M_{410} \rightarrow B_{570}$	thermisch	$M_{\text{decay T}}, B_{\text{recovery T}}$	

Ausgehend von der Applikation als photochromes OVD sollen zur Abmusterung durch den Nutzer ubiquitär verfügbare Lichtquellen zum Einsatz kommen. Hierbei handelt es sich ausnahmslos um breitbandige Strahlungsquellen, wie z.B. Glühlampen, Halogenlampen oder Leuchtstofflampen (siehe Abb. 28). Die Abmusterung erfolgt durch Bestrahlen des OVDs mit einer geeigneten Strahlungsquelle, z.B. Schreibtischlampe, Stifttaschenlampe oder helles Umgebungslicht, wodurch der Farbwechsel von lila nach gelb induziert wird. In einem zweiten Schritt wird das OVD von der Strahlungsquelle entfernt und im verminderten Umgebungslicht der thermische Farbübergang von lila nach gelb durchgeführt. Da die hierfür verwendeten Strahlungsquellen sowohl in die B_{570} -, als auch in die M_{410} -Absorptionsbande einstrahlen, können die photoinduzierten Übergänge von M_{410} nach B_{570} und viceversa nicht dediziert betrachtet werden, da sie simultan stattfinden und sich ein dynamisches Gleichgewicht einstellt. Da die Optimierung der OVDs für diesen realen Anwendungszweck erfolgen soll, wurden zur Charakterisierung der Photochromie nur breitbandige Strahlungsquellen verwendet.

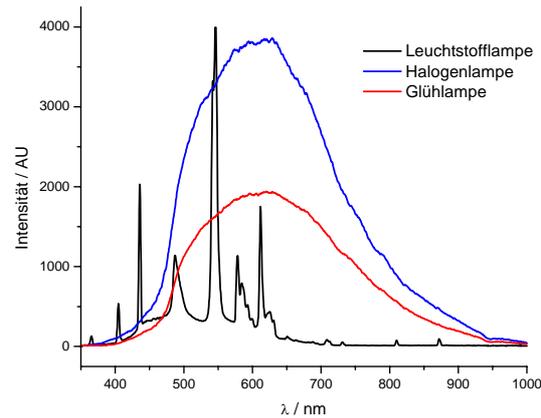


Abb. 28: Intensitätsverteilung als Funktion der Wellenlänge für die verschiedenen Strahlungsquellen.

Neben der Intensitätsverteilung der Strahlungsquelle, stellt auch die Intensität der Strahlung eine Einflussgröße der Photochromie dar. Ein photochromes OVD muss einen ausgeprägten Farbwechsel bei normalem Umgebungslicht, also ca. 700 - 1,500 lx (Büro - allgemeine Bürotätigkeit) ^[107], zeigen. Diese Lichtintensität stellt eine sinnvolle untere Grenze dar. Höhere Lichtintensitäten, wie z. B. direktes Sonnenlicht 70,000-100,000 lx ^[108], führen in erster Linie zu einem schnelleren $B_{570} \rightarrow M_{410}$ Übergang ^[109].

Die Kinetik der thermischen Relaxation des $M_{410} \rightarrow B_{570}$ Übergangs ist naturgemäß eine Funktion der Temperatur. So erfolgt bei tiefen Temperaturen die Rückkehr zum Grundzustand langsamer (siehe Abb. 29). Als Lebensdauer $\tau_{1/e}$ wird hier das Zeitintervall bezeichnet, nachdem bis auf $1/e$ alle BR Moleküle wieder im Ausgangszustand B_{570} vorliegen ^[10].

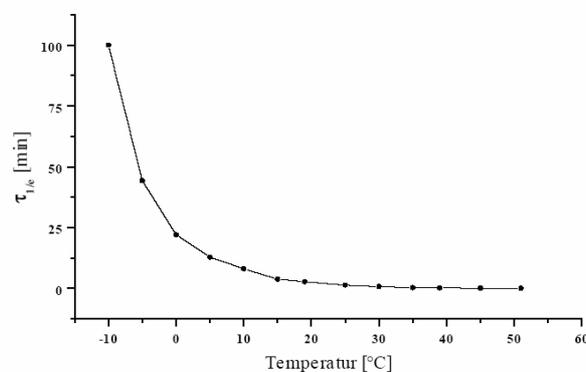


Abb. 29: Lebensdauer $\tau_{1/e}$ eines BR-D96N Films als Funktion der Temperatur (70 % rLF, pH 9.5).
Abb. aus ^[10].

Für den Bereich von 10 °C bis 50 °C zeigt die Lebensdauer $\tau_{1/e}$ und damit die Photochromie keine starke Temperaturabhängigkeit. Ein BR-basierendes OVD sollte also innerhalb dieses Fensters, das den normalen Temperaturen im Einsatzbereich entspricht, weitgehend gleiche photochrome Eigenschaften zeigen. Die Charakterisierung der photochromen Eigenschaften der Drucke wurde bei Raumtemperatur, also ca. 20 °C, durchgeführt.

Weiterhin hat der Wassergehalt von BR-haltigen Filmen und Drucken einen starken Einfluss auf die Kinetik der Photochromie (siehe Abb. 30). Als Lebensdauer τ_{50} wird hier das Zeitintervall bezeichnet, nachdem bis auf 50 % alle BR Moleküle wieder im Ausgangszustand B_{570} vorliegen ^[95]. Da sich der Wassergehalt der Proben nur schwer direkt bestimmen lässt, wird im Folgenden die relative Luftfeuchtigkeit rLF angegeben bei der die Proben klimatisiert wurden (siehe Kapitel 3.8.4). Deutlich ist beim Übergang von 90 % rLF auf 53 % rLF der Anstieg der Lebensdauer τ_{50} zu erkennen. Denn sowohl der interne ^[110], als auch der externe Protonentransport, beide Grundlage der Photochromie, erfolgen teilweise über Wassermoleküle. Durch Verminderung des Wassergehaltes steigt die durchschnittliche Zeit für den Protonentransport zwischen zwei Wassermolekülen (siehe Grotthuß-Mechanismus ^[111]), wobei sich dieser Effekt stärker auf den Übergang $M_{410} \rightarrow B_{570}$ auswirkt ^[95]. Die Charakterisierung der Drucke wurde für verschiedene Luftfeuchtigkeiten durchgeführt, der Schwerpunkt lag hierbei bei einer Luftfeuchtigkeit von 60 % rLF. Dieser Wert wird vom Menschen als angenehm empfunden und ist somit gängig in klimatisierten Räumen, so liegt z.B. der Sollbereich für Büroräume bei 50 % rLF bis 65 % rLF ^[112].

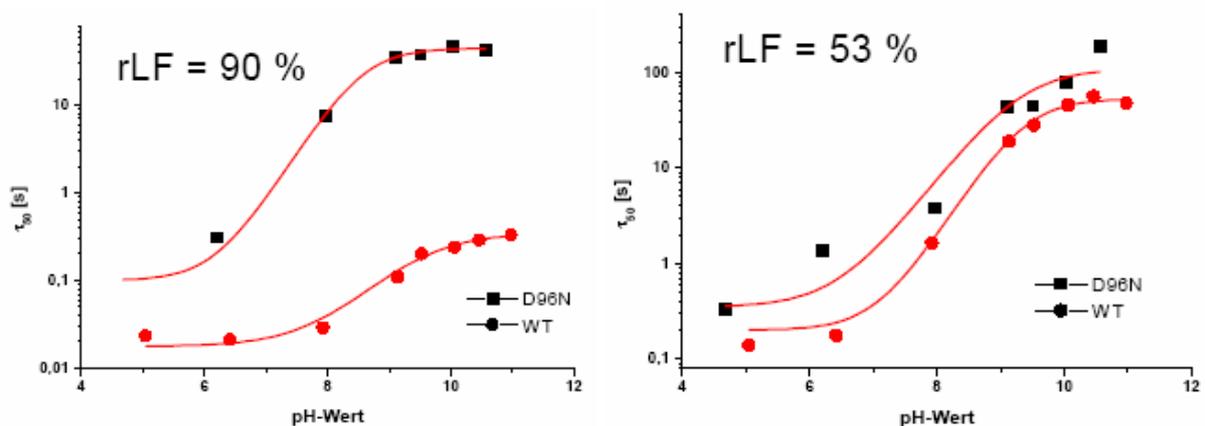


Abb. 30: Lebensdauer τ_{50} von BR-Gelatine-Filmen als Funktion der Luftfeuchte rLF, der verwendeten Mutante und des pH-Wertes. Abb. aus ^[95].

Neben der Transportgeschwindigkeit der Protonen bestimmt durch den Wassergehalt der Probe, stellt auch die Protonenverfügbarkeit eine entscheidende Einflussgröße der Photochromie. So kann, wie bereits eingangs beschrieben (siehe Kapitel 5.2.1.1), durch geeignete genetische Modifikation die intramembrane Protonenverfügbarkeit beeinflusst werden. So wird z. B. in der D96N Mutante der Übergang von $M_{410} \rightarrow B_{570}$ durch Austausch der Asparaginsäure-96 gegen Asparagin verlangsamt, da die Reprotonierung nun nur direkt von der zytoplasmatischen Seite erfolgen kann (siehe Abb. 30) [92]. Der pH-Wert im umgebenden Medium beeinflusst vor allem die extramembrane Protonenverfügbarkeit, die essentiell für die Reprotonierung der Schiffsbasis beim Übergang von $M_{410} \rightarrow B_{570}$ ist (siehe Kapitel 2.4). Hierbei gilt, je höher der pH-Wert, desto langsamer die Reprotonierung und der $M_{410} \rightarrow B_{570}$ Übergang (siehe Abb. 30). So beträgt im Neutralen (pH = 7) bei 53 % rLF die Lebensdauer für die Mutante D96N $\tau_{50} = 1.5$ s. Für einen vom Betrachter mit dem Auge einfach abzumusternden Farbwechsel ist diese Lebensdauer deutlich zu kurz. Das photochrome OVD würde hier schon sehr kurz nach Entfernen aus der Strahlungsquelle, die für die Induzierung des $B_{570} \rightarrow M_{410}$ -Übergangs benötigt wird, komplett relaxiert sein. Somit ist es sinnvoll durch Erhöhung des pH-Werts der umgebenden Matrix die Lebensdauer zu vergrößern.

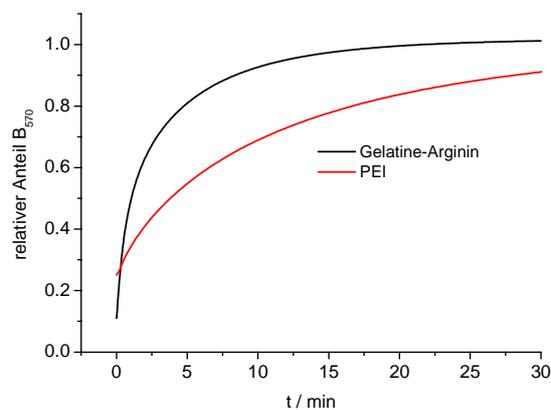


Abb. 31: Thermische Relaxation von D96N-Filmen nach Bestrahlung mit intensivem Glühlampenlicht. (60 % rLF, Detektion bei $\lambda = 560$ nm). Abb. aus [52].

Die Protonenbeweglichkeit und -verfügbarkeit ergibt sich durch die Kombination aus Bindemittel, Additiven und Bedruckstoff. Als Bedruckstoff wurde normales Papier Typ nopaPlus und Glossy Typ HP C3837A gewählt. Das Bindemittel PEI beeinflusst durch seine polybasischen Eigenschaften die thermische Relaxation hin zu längeren Lebensdauern (siehe

Abb. 31). Durch Kombination mit den Additiven Arginin und Acetat kann die Lebensdauer der Drucke auf den gewünschten Wert eingestellt werden ^[52, 109]. Der Vorteil in der Verwendung von polybasischen Bindemitteln liegt in einem dadurch reduzierten Zusatz an Arginin und Acetat, die in höheren Konzentrationen beim Trocknen der Drucke zum Aussalzen neigen.

Basierend auf den für die verschiedenen Einflussfaktoren der Photochromie gewählten Parametern (siehe Tab. 14) wurde in einem iterativen Prozess durch Variation der Zusätze an Additiv Arginin und Acetat die Lebensdauer, durch Variation der Protonenbeweglichkeit und -verfügbarkeit, im gewünschten Bereich eingestellt (siehe Tab. 13).

Das photochrome Verhalten der erzeugten Drucke wurde im Folgenden charakterisiert. Um den systematischen Fehler, der durch photochemische Reaktion der Probe auf das Messlicht hervorgerufen wird, zu minimieren, wurden für die zu messenden Übergänge - photoinduziert $B_{570} \rightarrow M_{410}$ und thermisch $M_{410} \rightarrow B_{570}$ - unterschiedliche Messverfahren verwendet (siehe Kapitel 3.3.3 & 3.3.4). Als charakteristische Größe der Kinetik wurde die Reflektion der Drucke in der Nähe des OD-Maximums des B_{570} Grundzustandes als Funktion der Zeit bestimmt. Zur Beschreibung und Quantifizierung des Farbeindrucks wurden zeitaufgelöste Farbmessungen im CIELAB-Farbraum durchgeführt. Die Drucke wurden jeweils vor den Messungen klimatisiert (siehe Kapitel 3.8.4) und für die Messung zwischen zwei Glasplatten eingebracht, um eine konstante relative Luftfeuchtigkeit zu gewährleisten. Falls nicht anders erwähnt, wurden alle Proben vor der Messung lichadaptiert (siehe Kapitel 3.1.1.6).

5.2.3.3.1 Charakterisierung des photoinduzierten Überganges $B_{570} \rightarrow M_{410}$

Die Bleichkinetik wurde bei konstanter Beleuchtung durch eine polychromatische Lichtquelle (siehe Abb. 28) verfolgt. Zur Charakterisierung der Bleichkinetik wurden zeitaufgelöste UV/vis-Reflektionsspektren mittels eines Faser-CCD-Array-Spektrometers vom Typ ADC 1000 USB / AVS-S2000 (Ocean Optics, Duiven, NL) aufgezeichnet (siehe Kapitel 3.3.4). Für kinetische Betrachtungen wurde die OD-Änderung bei $\lambda = 570$ nm herangezogen. Zur Farbdarstellung wurden die Reflektionsspektren gemäß ASTM International in den CIELAB Farbraum transferiert (siehe Kapitel 3.3.3) ^[61]. Für die Messung wurde das B_{570} - M_{410} -Gleichgewicht mittels einer LED-Lichtquelle ($\lambda_{\max} = 405$ nm) in Richtung B_{570} -Intermediat verschoben.

Ausgehend von dem zuvor formulierten vereinfachten Photozyklus (siehe Kapitel 5.2.1.2) wird postuliert, dass die Geschwindigkeit der Bleichung sowohl 1. Ordnung im Bezug auf die Konzentration an B_{570} , als auch 1. Ordnung im Bezug auf die Beleuchtungsstärke E ist. Somit ergibt sich für den photoinduzierten Übergang von $B_{570} \rightarrow M_{410}$ das folgende hypothetische Geschwindigkeitsgesetz (für eine Betrachtung in der Nähe des Gleichgewichts zwischen M_{410} und B_{570} siehe Gleichung (32)):

$$\frac{d[B_{570}]}{dt} = -k_B [B_{570}] E \quad (27)$$

mit $[B_{570}]$ Konzentration an B_{570}
 t Zeit
 k_B Reaktionskonstante
 E Beleuchtungsstärke

Im formulierten Geschwindigkeitsgesetz wurde bewusst die Beleuchtungsstärke verwendet, da diese Größe gängig zur Quantifizierung polychromatischer Beleuchtung ist. Die Umrechnung von Beleuchtungsstärke in Watt ist nur für monochromatisches Licht bei einer Frequenz von 540 THz, entsprechend etwa 555 nm, definiert. Es gilt $1000 \text{ lx} = 1.464 \text{ W/m}^2$.

Da die Beleuchtungsstärke während des Bleichvorgangs konstant gehalten wurde, kann nach der Isoliermethode das Geschwindigkeitsgesetz wie folgt vereinfacht werden ^[111]:

$$\frac{d[B_{570}]}{dt} = -k_B' [B_{570}] \quad (28)$$

mit k_B' Reaktionskonstante pseudo-erster Ordnung

Das so erhaltene Geschwindigkeitsgesetz pseudo-erster Ordnung, stellt eine Differentialgleichung mit folgender Lösung dar:

$$\ln\left(\frac{[B_{570}]}{[B_{570}]_0}\right) = -k_B' t \quad (29)$$

mit $[B_{570}]_0$ Konzentration an B_{570} zum Zeitpunkt $t = 0 \text{ s}$

Die Konzentration von B_{570} ergibt sich direkt nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz aus der optischen Dichte bei $\lambda = 570$ nm:

$$\ln\left(\frac{OD^*_{570}\epsilon_{570}}{OD^*_{570/0}\epsilon_{570}}\right) = -k_B't \quad (30)$$

mit OD^*_{570} Optische Dichte bei $\lambda = 570$ nm
 $OD^*_{570/0}$ Optische Dichte bei $\lambda = 570$ nm zum Zeitpunkt $t = 0$ s
 ϵ_{570} Extinktionskoeffizient bei $\lambda = 570$ nm

Da die Messungen in Reflektion erfolgt, stellt die gemessene optische Dichte, im Folgenden als OD^* bezeichnet, nur eine Hilfsgröße in freien Einheiten (arbitrary units) dar und ist nicht direkt mit der OD in Transmission vergleichbar.

$$\ln OD^*_{570} = -k_B't + \ln OD^*_{570/0} \quad (31)$$

Wie Gleichung (31) zeigt, ist für die Bleichreaktion $B_{570} \rightarrow M_{410}$ (pseudo-erster Ordnung) bei Auftragung von $\ln OD^*_{570}$ gegen t eine Gerade mit der Steigung $-k_B'$ zu erwarten.

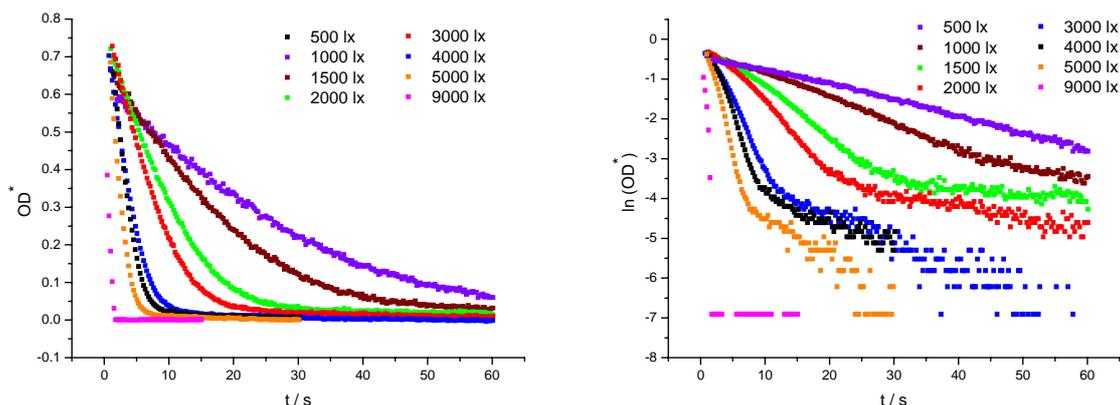


Abb. 32: Bleichkinetik eines fünffach Drucks der BR-Tampondruckfarbe auf Glossy für verschiedene Beleuchtungsstärken (Halogenlampe, 60 % rLF, Detektion bei $\lambda = 570$ nm).

Abb. 32 (rechts) zeigt einen linearen Zusammenhang des Reaktionsverlaufs für das Zeitintervall von 0 % bis ca. 90 % bezogen auf den Logarithmus der B_{570} -Konzentration. Für den Zeitraum > 90 % zeigt sich im Vergleich eine veränderte Bleichkinetik. Hier in der Nähe

des Gleichgewichts zwischen B_{570} und M_{410} wird neben der photochemischen Bleichung (Hinreaktion), auch die photochemische und thermische Relaxation (Rückreaktion) dominant und das vereinfachte Geschwindigkeitsgesetz aus Gleichung (27) verliert seine Gültigkeit und es gilt folgendes Geschwindigkeitsgesetz:

$$\frac{d[B_{570}]}{dt} = -k_B'[B_{570}] + k_M[M_{410}] \quad (32)$$

mit $[M_{410}]$ Konzentration an M_{410}
 k_M Reaktionskonstante

Somit stellt das in Gleichung (27) formulierte Geschwindigkeitsgesetz eine Näherung dar und ergibt sich aus Gleichung (32) unter den Bedingungen, dass $[B_{570}] \gg [M_{410}]$ und / oder $k_B' \gg k_M$ ist, wobei k_B' proportional zur Beleuchtungsstärke E ist (siehe Abb. 36).

Für die kinetische Beschreibung des Bleichvorgangs ist die Vereinfachung des Geschwindigkeitsgesetzes als legitim anzusehen, da es für das Zeitintervall von 0 % bis ca. 90 % des Reaktionsverlaufs ein zufrieden stellendes Ergebnis liefert.

Der Zeitraum > 90 % ist als irrelevant anzusehen, da hier nur noch minimale Konzentrationsänderungen erfolgen und damit die abmusterbare Farbänderung vernachlässigbar klein ist und kaum von einem Betrachter wahrgenommen wird.

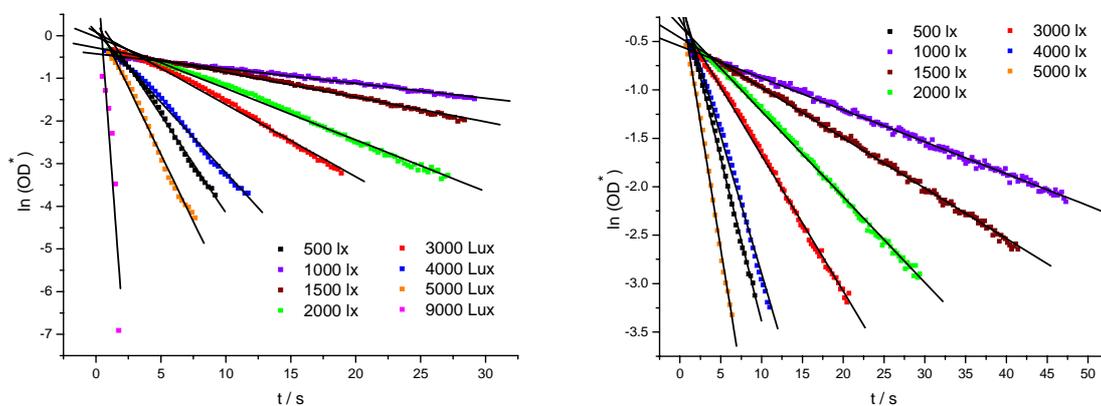


Abb. 33: Bleichkinetik eines fünffach Drucks der BR-Tampondruckfarbe auf Glossy (links) und Papier (rechts) für verschiedene Beleuchtungsstärken (Halogenlampe, 60 % rLF, Detektion bei $\lambda = 570$ nm).

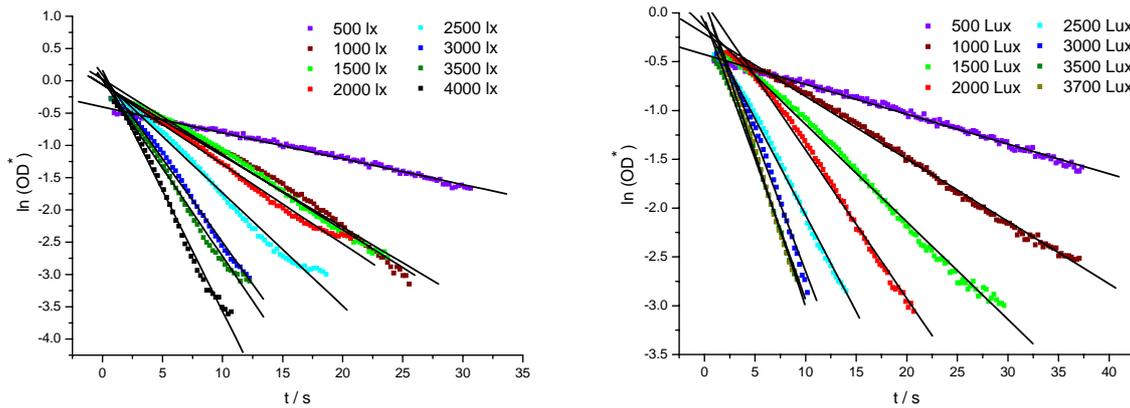


Abb. 34: Bleichkinetik eines fünffach Drucks der BR-Tampondruckfarbe auf Glossy (links) und Papier (rechts) für verschiedene Beleuchtungsstärken (Glühlampe, 60 % rLF, Detektion bei $\lambda = 570$ nm).

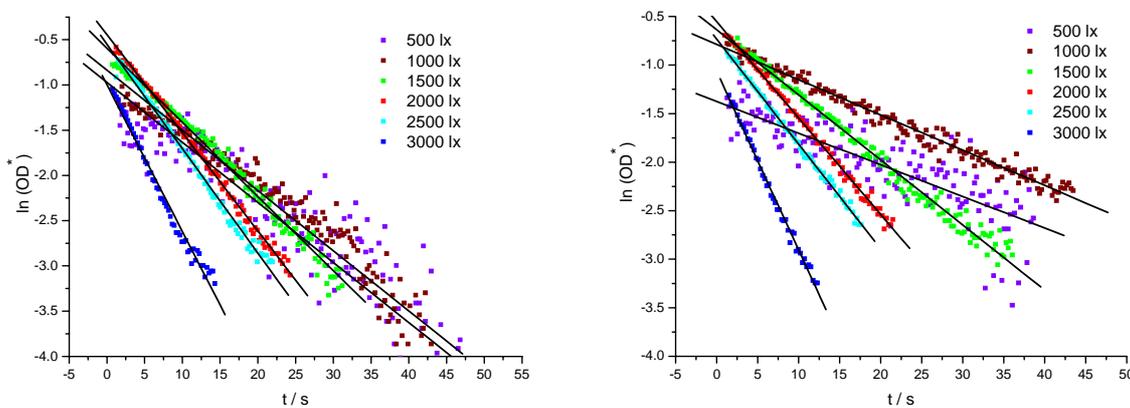


Abb. 35: Bleichkinetik eines fünffach Drucks der BR-Tampondruckfarbe auf Glossy (links) und Papier (rechts) für verschiedene Beleuchtungsstärken (Leuchtstofflampe, 60 % rLF, Detektion bei $\lambda = 570$ nm).

Im Folgenden wurde die Bleichkinetik als Funktion der Beleuchtungsstärke und der Lichtquelle für fünffach Drucke der BR-Tampondruckfarbe auf Glossy und Papier untersucht (siehe Abb. 33 bis Abb. 35). Hierbei zeigt sich ebenfalls ein linearer Zusammenhang für $\ln(\text{OD}^*)$ als Funktion der Zeit t für das Zeitintervall von 0 % bis ca. 90 % des Reaktionsverlaufs. Die sich aus den linearen Regressionen als Steigung ergebenden Reaktionskonstanten $-k_B'$ als Funktionen der Beleuchtungsstärke und der verwendeten Lichtquellen sind in Abb. 36 dargestellt.

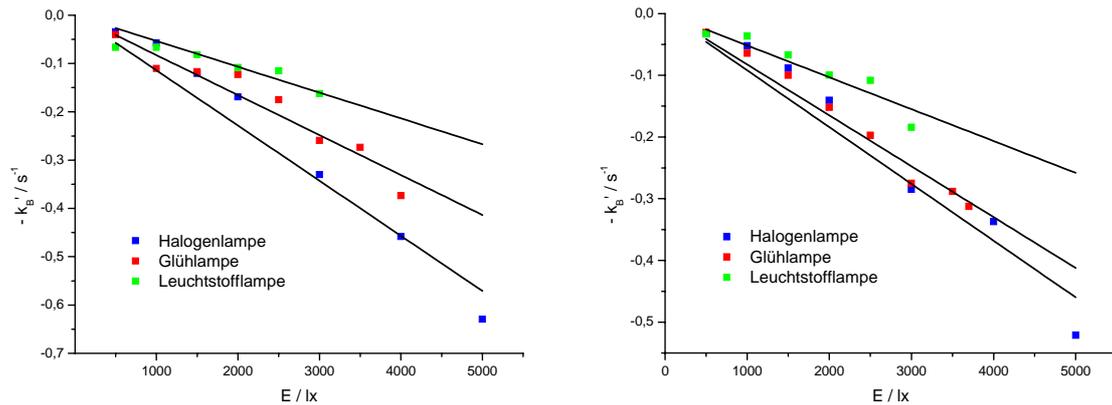


Abb. 36: Geschwindigkeitskonstante $-k_B'$ von fünffach Drucken der BR-Tampondruckfarbe auf Glossy (links) und Papier (rechts) als Funktion der Beleuchtungsstärke E für verschiedene Lichtquellen bei 60 % rLF.

Entsprechend dem zuvor mittels Isoliermethode vereinfachten Geschwindigkeitsgesetz (siehe Gleichung (27) und (28)), gilt:

$$k_B' = k_B E \quad (33)$$

Somit ist nach Gleichung (33) für die Auftragung von $-k_B'$ gegen E eine Ursprungsgrade mit der Steigung $-k_B$ zu erwarten. Die sich aus den in Abb. 36 durchgeführten Regressionen ergebenden Geschwindigkeitskonstanten k_B sind in Tab. 16 aufgeführt. In diesem Zusammenhang zeigt sich, dass der lineare Zusammenhang als Näherung betrachtet werden muss, aber das bleichkinetische Verhalten von Drucken als Funktion der Beleuchtungsstärke hinreichend beschreibt.

Tab. 16: Geschwindigkeitskonstante k_B von fünffach Drucken der BR-Tampondruckfarbe auf Glossy und Papier für verschiedene Lichtquellen bei 60 % rLF.

Leuchtkörper	Glossy		Papier	
	$k_B / s^{-1}lx^{-1}$	Standardfehler / $s^{-1}lx^{-1}$	$k_B / s^{-1}lx^{-1}$	Standardfehler / $s^{-1}lx^{-1}$
Halogenlampe	0.00011	$\pm 6.209 \cdot 10^{-6}$	0.00009	$\pm 5.6214 \cdot 10^{-6}$
Glühlampe	0.00008	$\pm 4.0395 \cdot 10^{-6}$	0.00008	$\pm 2.4661 \cdot 10^{-6}$
Leuchtstofflampe	0.00005	$\pm 4.2789 \cdot 10^{-6}$	0.00005	$\pm 3.8705 \cdot 10^{-6}$

Ein Vergleich von Drucken auf den Bedruckstoffen Glossy und Papier, zeigt abgesehen von den Werten für die Halogenlampe, die gleichen Geschwindigkeitskonstanten k_B . Somit hat die leicht basische Beschichtung der Glossyoberfläche keinen starken Einfluss auf die

Bleichkinetik der Drucke. Im Allgemeinen nimmt die Geschwindigkeitskonstante k_B und damit die Bleichgeschwindigkeit von der Halogenlampe über die Glühlampe zur Leuchtstofflampe hin ab. Werden die Intensitätsverteilungen der entsprechenden Lichtquellen als Funktion der Wellenlänge mit einbezogen (siehe Abb. 28), zeigt sich im Vergleich für die Glühlampe und die Halogenlampe eine ähnliche Intensitätsverteilung mit einer Dominanz im längerwelligen Bereich und für die Leuchtstofflampe eine von den übrigen Lichtquellen abweichende Verteilung mit einer Dominanz im kürzerwelligen Bereich. Bezogen auf das Bleichverhalten als Funktion der Intensitätsverteilung der Lichtquelle (siehe Kapitel 5.2.3.3), ist für die Lichtquellen Halogenlampe und Glühlampe eine fast gleiche Bleichkinetik zu erwarten, im Vergleich für die Leuchtstofflampe eine kleinere Geschwindigkeitskonstante k_B . Dieses Postulat deckt sich mit den gemessenen Konstanten k_B .

Eine anschauliche Größe der Geschwindigkeit einer Reaktion erster Ordnung ist die Halbwertszeit, also die Zeit, in der die Konzentration der Substanz auf die Hälfte ihres Anfangswerts abnimmt. Die Halbwertszeit der Bleichkinetik ergibt sich nach Gleichung (27):

$$Ek_B t_{\frac{1}{2}} = -\ln \left(\frac{\frac{1}{2} [B_{570}]_0}{[B_{570}]_0} \right) = -\ln \frac{1}{2} = \ln 2 \quad (34)$$

mit $t_{\frac{1}{2}}$ Halbwertszeit

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln 2}{Ek_B} \quad (35)$$

Gemäß Gleichung (35) wurden verschiedene Halbwertszeiten der Bleichkinetik berechnet (siehe Tab. 17).

Tab. 17: Halbwertszeiten von fünffach Drucken der BR-Tampondruckfarbe auf Papier für verschiedene Lichtquellen und Beleuchtungsstärken bei 60 % rLF.

Lichtquelle	Konstante $k_B / s^{-1}lx^{-1}$	Beleuchtungsstärke / lx	Halbwertszeit / s
Leuchtstofflampe	0.00005	1,000	13.9
Glühlampe	0.00008	2,500	3.5
Sonnenlicht	(0.00007)	70,000	0.1

Als untere Schwelle kann eine 1,000 lx Leuchtstofflampenbeleuchtung angesehen werden [107]. Zur Standardabmusterung unter Kunstlicht wird zumeist eine dedizierte Strahlungsquelle, wie z. B. eine Schreibtischlampe oder Stifttaschenlampe verwendet, also eine Glühlampe mit ca. 2,500 lx herangezogen. Für Sonnenlicht wurde eine Beleuchtungsstärke von 70,000 lx angesetzt [106], die Geschwindigkeitskonstante wurde durch Vergleich des Sonnenlichtspektrums mit den Intensitätsverteilungen der vermessenen Lichtquellen abgeschätzt. Im Vergleich zeigt sich deutlich die starke Abhängigkeit der Bleichgeschwindigkeit vom Umgebungslicht. Das mittels Additiven eingestellte Bleichverhalten stellt immer einen Kompromiss zwischen Bleichsensitivität und Bleichgeschwindigkeit als Funktion der Beleuchtungsstärke dar. Die hier entwickelte Druckfarbe wurde bevorzugt für den Kunstlichtbereich und sekundär für direkte Sonnenbestrahlung optimiert. Der Farbwechsel von lila nach gelb lässt sich unter Standardbedingungen bei einer Halbwertszeit $t_{1/2} = 3.5$ s leicht vom Betrachter abmuern.

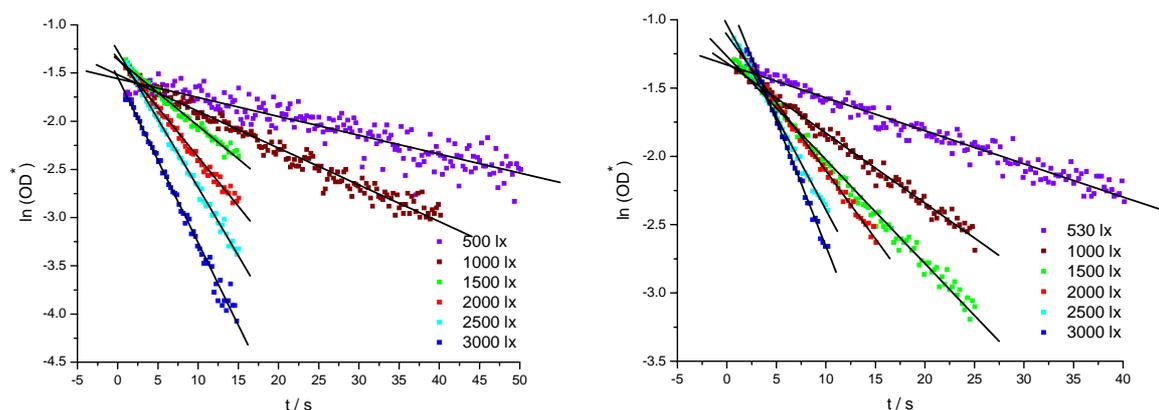


Abb. 37: Bleichkinetik eines fünffach Drucks der BR-Tampondruckfarbe auf Glossy (links) und Papier (rechts) für verschiedene Beleuchtungsstärken (Glühlampe, 15 % rLF, Detektion bei $\lambda = 570$ nm).

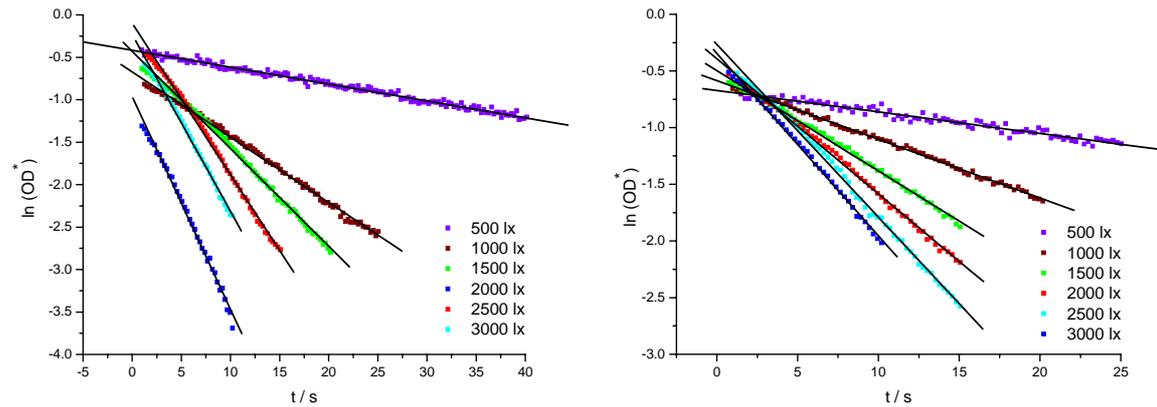


Abb. 38: Bleichkinetik eines fünffach Drucks der BR-Tampondruckfarbe auf Glossy (links) und Papier (rechts) für verschiedene Beleuchtungsstärken (Glühlampe, 40 % rLF, Detektion bei $\lambda = 570 \text{ nm}$).

Im Folgenden wurde die Bleichkinetik als Funktion der Beleuchtungsstärke und der relativen Luftfeuchtigkeit für fünffach Drucke der BR-Tampondruckfarbe auf Glossy und Papier untersucht (siehe Abb. 37 und Abb. 38). Hierbei zeigt sich ebenfalls ein linearer Zusammenhang für $\ln(\text{OD}^*)$ als Funktion der Zeit t für das Zeitintervall von 0 % bis ca. 90 % des Reaktionsverlaufs. Die sich aus den linearen Regressionen als Steigung ergebenden Reaktionskonstanten $-k_B'$ als Funktionen der Beleuchtungsstärke und der relativen Luftfeuchtigkeit sind in Abb. 39 dargestellt.

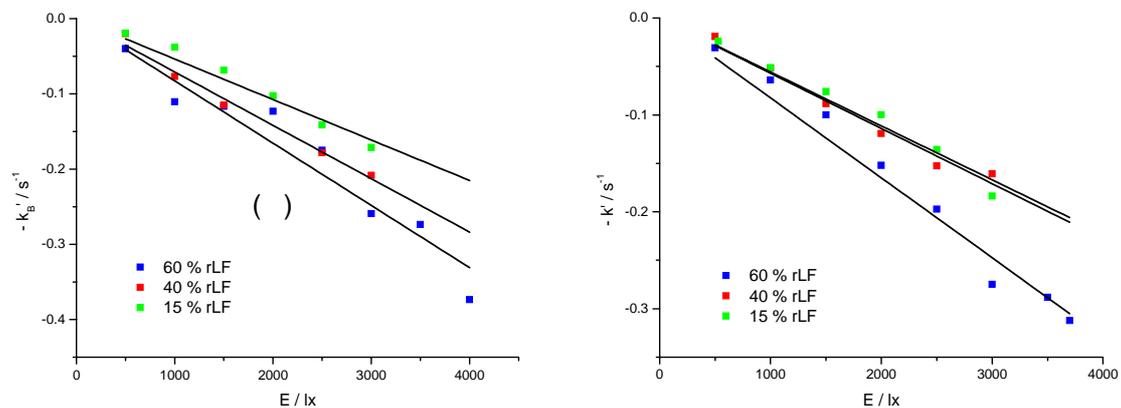


Abb. 39: Geschwindigkeitskonstante $-k_B'$ von fünffach Drucken der BR-Tampondruckfarbe auf Glossy (links) und Papier (rechts) als Funktion der Beleuchtungsstärke E für verschiedene relative Luftfeuchtigkeiten unter Glühlampenlicht.

Die sich aus den nach Gleichung (33) durchgeführten linearen Regressionen ergebenden Geschwindigkeitskonstanten k_B sind in Tab. 18 aufgeführt (siehe Abb. 39).

Tab. 18: Geschwindigkeitskonstante k_B von fünffach Drucken der BR-Tampondruckfarbe auf Glossy und Papier für verschiedene relative Luftfeuchtigkeiten unter Glühlampenlicht.

Luftfeuchtigk.	Glossy		Papier	
	$k_B / s^{-1}lx^{-1}$	Standardfehler / $s^{-1}lx^{-1}$	$k_B / s^{-1}lx^{-1}$	Standardfehler / $s^{-1}lx^{-1}$
60 % rLF	0.00008	$\pm 3.8855 \cdot 10^{-6}$	0.00008	$\pm 2.4661 \cdot 10^{-6}$
40 % rLF	0.00007	$\pm 2.2228 \cdot 10^{-6}$	0.00006	$\pm 1.7764 \cdot 10^{-6}$
15 % rLF	0.00005	$\pm 2.3228 \cdot 10^{-6}$	0.00006	$\pm 2.1698 \cdot 10^{-6}$

Ein Vergleich von Drucken auf den Bedruckstoffen Glossy und Papier, zeigt für die jeweilig betrachteten Luftfeuchtigkeiten, ähnliche Geschwindigkeitskonstanten k_B . Somit hat die Beschichtung der Glossyoberfläche, mit einem leicht basischen Charakter und der Fähigkeit zur Wasserspeicherung, nur einen leichten Einfluss auf die Bleichkinetik der Drucke. Im Allgemeinen nimmt die Geschwindigkeitskonstante k_B und damit die Bleichgeschwindigkeit mit abnehmender relativer Luftfeuchtigkeit ab. Also nimmt mit sinkendem Wassergehalt der Probe die Zeit, die zur Einstellung des stationären Zustands benötigt wird, zu. Dieses Verhalten wurde auch bei Charakterisierung von BR-Filmen auf Gelatinebasis beobachtet ^[95]. Allerdings wurden hier nur Untersuchungen für 95 % rLF und 30 % rLF durchgeführt. Hierbei zeigte die Probe mit 95 % rLF weitgehend das Verhalten einer Suspension und somit fällt die sich ergebende Abnahme der Bleichgeschwindigkeit beim Übergang auf 30 % rLF entsprechend größer aus.

Da eine Änderung der Quantenausbeute der Bleichreaktion durch die Trocknung ausgeschlossen werden kann ^[113-116], ist es wahrscheinlich, dass beim Übergang von L_{550} nach M_{410}^1 die Abgabe des Protons an Aspartat-85 unter gleichzeitiger Deprotonierung des benachbarten Protonreleasecomplex (PRC) an das extrazelluläre Medium durch den reduzierten Wassergehalt gehemmt wird (siehe Kapitel 2.4). Eine Akkumulation des L_{550} Intermediats wird allerdings nicht beobachtet ^[95], mögliche Erklärungen hierfür sind eine photochemische Rückreaktion von L_{410} nach B_{570} und/oder ein Gleichgewicht zwischen L_{550} und K_{590} mit anschließender photochemischer Rückreaktion von K_{590} nach B_{570} ^[117].

Gemäß Gleichung (35) wurden verschiedene Halbwertszeiten der Bleichkinetik berechnet (siehe Tab. 19).

Tab. 19: Halbwertszeiten von fünffach Drucken der BR-Tampondruckfarbe auf Papier unter Glühlampenlicht für verschiedene Luftfeuchtigkeiten.

Feuchte / % rLF	Konstante $k_B / s^{-1}lx^{-1}$	Beleuchtungsstärke / lx	Halbwertszeit / s
60	0.00008	2,500	3.5
40	0.00006	2,500	4.6
15	0.00006	2,500	4.6

Ein Vergleich der Halbwertszeiten unter Standardabmusterungsbedingungen für verschiedene relative Luftfeuchtigkeiten zeigt, dass bei einer Abnahme der Feuchtigkeit die Halbwertszeit leicht ansteigt, wobei der Farbwechsel von lila nach gelb bei einer Halbwertszeit $t_{1/2} = 4.6$ s weiterhin leicht vom Betrachter abmusterbar bleibt.

Das sich aus Gleichung (27) durch Verwendung der Isoliermethode ergebende Geschwindigkeitsgesetz (siehe Gleichung (28)) gilt nur solange die eingestrahlte Intensität konstant und die Anzahl der Photonen groß gegenüber der Anzahl der BR-Moleküle ist. Sind diese Bedingungen erfüllt, stellt die gemessene Geschwindigkeitskonstante k_B keine Funktion der Initialkonzentration $[B_{570}]$ und somit der optischen Dichte des Drucks dar.

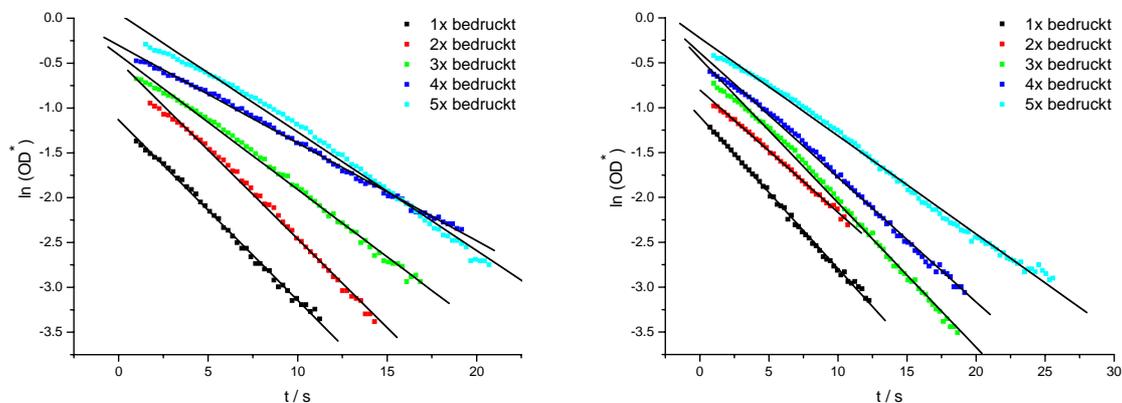


Abb. 40: Bleichkinetik der BR-Tampondruckfarbe auf Glossy (links) und Papier (rechts) für verschiedene Druckstärken (Glühlampe $E = 1500$ lx, 60 % rLF, Detektion bei $\lambda = 570$ nm).

In Abb. 40 ist die Bleichkinetik als Funktion der Druckstärke dargestellt. Die sich aus den nach Gleichung (33) durchgeführten linearen Regressionen ergebenden Geschwindigkeitskonstanten k_B' sind in Tab. 20 aufgeführt.

Tab. 20: Geschwindigkeitskonstante k_B' von der BR-Tampondruckfarbe auf Glossy und Papier für verschiedene Druckstärken unter Glühlampenlicht bei 60 % rLF.

Druckstärke	Glossy		Papier	
	$k_B' / s^{-1}lx^{-1}$	Standardfehler / $s^{-1}lx^{-1}$	$k_B' / s^{-1}lx^{-1}$	Standardfehler / $s^{-1}lx^{-1}$
1x	0.20088	0.00181	0.16934	0.00124
2x	0.19785	0.00188	0.13623	0.00107
3x	0.15011	0.00124	0.16084	0.00116
4x	0.10896	0.00061	0.13875	0.00092
5x	0.13209	0.00139	0.10921	0.00074

Die Geschwindigkeitskonstanten k_B' zeigen als Funktion der Druckstärke kein rein systematisches Verhalten. Im Vergleich der Messwerte zeigt sich eine Tendenz zu höheren Geschwindigkeiten bei geringerer Druckstärke. Dieser Effekt beruht auf einer zeitlichen Änderung der Reflektion der Drucke als Funktion der Schichtdicke. Um dies zu berücksichtigen, muss die Probe in infinitesimal kleine Schichten unterteilt werden und die Reflektion dann für jede Schicht rekursiv berechnet werden [95, 118]. Nach diesem Schichtenmodell ergibt sich, analog zu den Messungen in Tab. 20, eine Abnahme der Geschwindigkeitskonstante k_B' bei Zunahme der optischen Dichte [95]. Die unsystematischen Abweichungen ergeben sich aus einem nicht perfekt reproduzierbaren Pastenübertragungsverhalten bei Mehrfachdruck und damit einer variierenden optischen Dichte der Drucke bei gleicher Druckstärke.

Im Folgenden wurde der kinetische Verlauf des Bleichvorgangs im CIELAB Farbraum untersucht (siehe Abb. 41).

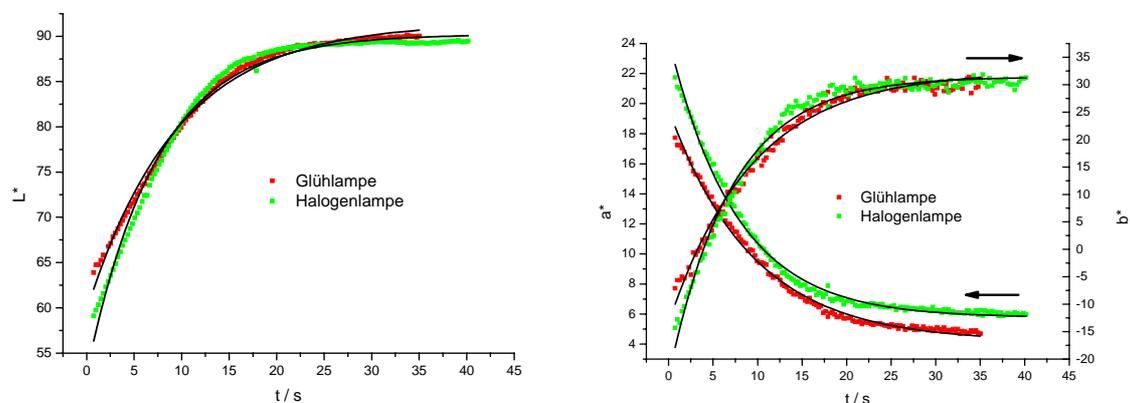


Abb. 41: Zeitlicher Verlauf von L^* , a^* und b^* beim photochemischen Übergang $B_{570} \rightarrow M_{410}$ eines fünffach Drucks der BR-Tampondruckfarbe auf Glossy für verschiedene Lichtquellen ($E = 1500 \text{ lx}$, 60 % rLF, Lichtart A/10°).

Es zeigt sich, dass das kinetische Bleichverhalten von L^* , a^* und b^* als Funktion der Zeit mittels einer Exponentialfunktion erster Ordnung angenähert werden kann:

$$y = A e^{\left(\frac{k}{t}\right)} + y_0 \quad (36)$$

mit	y	L^* , a^* bzw. b^* - Farbwert
	A	Vorfaktor
	k	Exponentialkoeffizient
	t	Zeit
	y_0	y-Achsenabschnitt

Ein Vergleich des zeitlichen Verlaufs für die Lichtquellen Glühlampe und Halogenlampe zeigen, wie schon in Zusammenhang mit Tab. 16 diskutiert, aufgrund der gleichen Intensitätsverteilung der Strahlungsquelle eine vergleichbare Bleichkinetik im CIELAB-Farbraum.

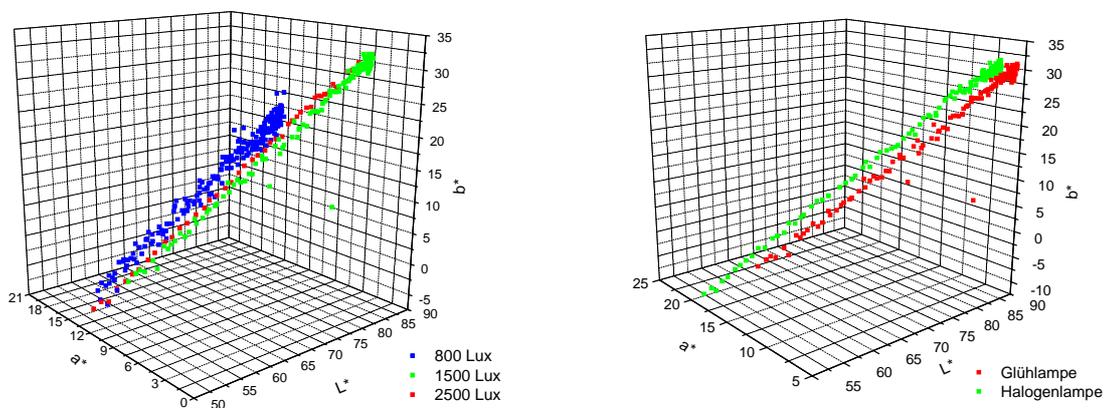


Abb. 42: Verlauf von L^* , a^* und b^* beim photochemischen Übergang $B_{570} \rightarrow M_{410}$ eines fünffach Drucks der BR-Tampondruckfarbe auf Glossy für verschiedene Lichtquellen und Beleuchtungsstärken (60 % rLF, Lichtart A/10°). Links: Glühlampe. Rechts: $E = 1500$ lx.

In Abb. 42 ist der Verlauf der Farbveränderung im CIELAB-Farbraum für den Bleichvorgang dargestellt. In den Spektren verläuft der Bleichvorgang zeitlich von großen a^* und geringen b^* & L^* Werten zu geringen a^* und großen b^* & L^* Werten (siehe Abb. 41). Ausgehend von den Zweizustandsmodell mit dem Ausgangszustand B_{570} und dem Intermediat M_{410} (siehe Kapitel 5.2.1.2), ergeben sich für die beiden reinen Zustände für eine gegebene OD zwei definierte Ausgangsfarben im CIELAB-Farbraum. Diese beiden Farben stellen zugleich die Endpunkte

der photochromen Farbänderung dar. Die sich beim Bleichvorgang einstellenden Zwischenfarbtöne entstehen durch additive Farbmischung der beiden Grundfarben. Hierbei ergibt sich für das photochrome BR ein linearer Verlauf der Farbänderung im LAB-Farbraum, wobei die beobachteten Farbtöne (bezogen auf die gleiche Lichtart) keine Funktion der Lichtquelle und der Lichtintensität darstellen - die Abweichungen der Geraden von einander liegen mit $\Delta E^* < 5$ unter der Wahrnehmungsschwelle und können vernachlässigt werden. Nur wenn die Beleuchtungsstärke nicht mehr ausreicht den maximalen Farbabstand zu induzieren (siehe Abb. 44), ergibt sich ein verkürzter Bleichweg, wie er hier im Vergleich von $E = 800 \text{ lx}$ mit $E = 1500 \text{ lx}$ bzw. $E = 2500 \text{ lx}$ beobachtet wird. Die Lichtintensität und die Beleuchtungsart legen lediglich den Zeitpunkt während des Bleichvorganges fest, zu dem der entsprechende Farbton eingenommen wird.

5.2.3.3.2 Charakterisierung des thermischen Überganges $M_{410} \rightarrow B_{570}$

Zur Charakterisierung der Relaxationskinetik wurden zeitaufgelöste UV/vis-Reflektionsspektren und Farbmessungen mittels eines Handmessgeräts vom Typ Color-Guide 45/0 (BYKGardener, Geretsried) aufgenommen (siehe Kapitel 3.3.4). Dieses Messgerät zeichnet Reflektionsspektren in Wellenlängenintervallen von $\Delta\lambda = 20 \text{ nm}$ auf. Für kinetische Betrachtungen wurde daher die dem Absorptionsmaximum von B_{570} am nächsten liegende Wellenlänge von $\lambda = 560 \text{ nm}$ verwendet. Die Konversion der Messungen in den CIELAB Farbraum erfolgte vollautomatisch durch die Gerätesoftware (siehe Kapitel 3.3.3) ^[61]. Für die Messung wurde das B_{570} - M_{410} -Gleichgewicht mittels einer Lichtquelle (siehe Abb. 28) mit bekannter Beleuchtungsstärke in Richtung M_{410} -Intermediat verschoben. Die Relaxation wurde unter Lichtausschluss durch Messung von Reflektionsspektren verfolgt. Hierzu wurden in Intervallen von $\Delta t = 3 \text{ s}$ über einen Zeitraum von 3 min Spektren aufgezeichnet.

Zunächst wurde der induzierbare Farbabstand ΔE^* zwischen Grund- und Bleichzustand als Funktion der relativen Luftfeuchtigkeit und der Beleuchtungsstärke für verschiedene Druckstärken und Bedruckstoffe untersucht (siehe Abb. 43 und Abb. 44).

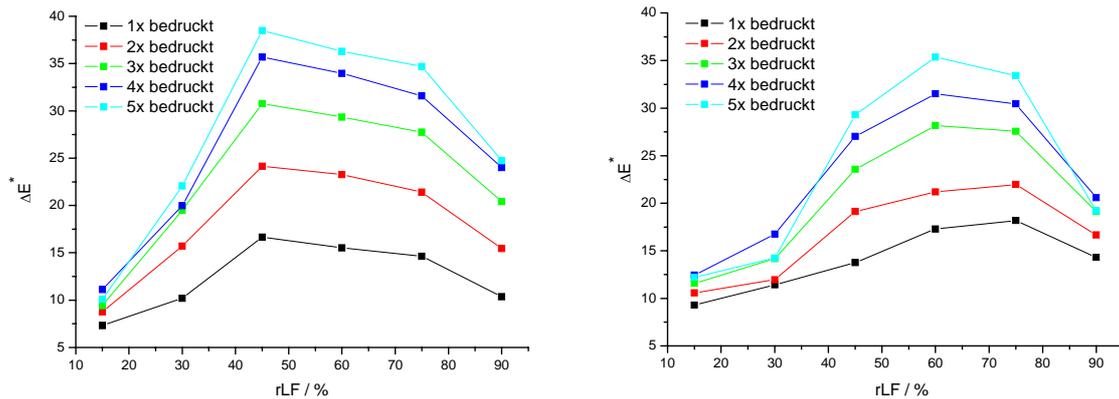


Abb. 43: Induzierbarer Farbabstand ΔE^* / Photochromie der BR-Tampondruckfarbe auf Glossy (links) und Papier (rechts) für verschiedene Druckstärken als Funktion der relativen Luftfeuchtigkeiten rLF (Glühlampe $E = 1000$ lx, Lichtart $D65/10^\circ$).

Es zeigt sich, dass der induzierbare Farbabstand als Funktion der Luftfeuchtigkeit ein Maximum aufweist. Das Maximum des Farbabstandes für Papier liegt bei ca. 60 % rLF , für Glossy bei 45 % rLF . Die maximalen Farbabstände sind hierbei für beide Bedruckstoffe gleich, geringe Abweichungen sind auf den nicht exakt reproduzierbaren Farbübertrag zurückzuführen. Die unterschiedliche Lage der Maxima bezogen auf die Luftfeuchtigkeit lässt sich auf den hohen Wassergehalt und teilweise auf den leicht basischen Charakter der Glossybeschichtung zurückführen. Somit kann diese als Wasserreservoir für die aufgebrachte Druckschicht fungieren und den Verlust an Luftfeuchtigkeit in der Umgebung ausgleichen. Dies erklärt auch die Ausbildung eines Plateaus mit einem ähnlichen induzierbaren Farbabstand im Bereich von ca. 40 % rLF bis 75 % rLF für die Drucke auf Glossy. Weiterhin begünstigt auch der leicht basische Charakter der Oberfläche eine Verschiebung des Maximums zu geringeren Luftfeuchtigkeiten.

Als Erklärung auf molekularer Ebene ergibt sich für geringe Luftfeuchtigkeiten eine Verzögerung des Übergangs von L_{550} nach M_{410}^I , mit den zuvor diskutierten Konsequenzen (siehe Kapitel 5.2.3.3.1). Für hohe Luftfeuchtigkeiten ist dieser Übergang nicht mehr limitierend, vielmehr wird die Bleichbarkeit durch den Übergang von M_{410}^{II} nach N_{560} bestimmt. Im Verlauf von M_{410}^{II} zu N_{560} wird in der Mutante D96N, der der Protonendonor Asparaginsäure fehlt, die Schiffsbasis direkt von der zytoplasmatischen Seite reprotoniert (siehe Kapitel 2.4). Erfolgt die Reprotonierung aufgrund eines hohen Wassergehalts und großer Protonenverfügbarkeit in der Probe unverzögert, wird das M_{410} -Intermediat nicht mehr

ausreichend akkumuliert und es ergibt sich ein geringerer induzierbarer Farbabstand. Somit gibt sich im Wechselspiel der beiden Übergänge ein Optimum der Bleichbarkeit.

Für photochrome OVDs erscheint es somit zur Gewährleistung eines großen Farbabstandes sinnvoll den Wassergehalt der Probe durch eine Barriere niedriger Wasserdampfdurchlässigkeit von der umgebenden Luftfeuchtigkeit abzuschirmen. Hierzu bietet sich eine Versiegelung der OVDs mittels Lamination bzw. Lackierung an.

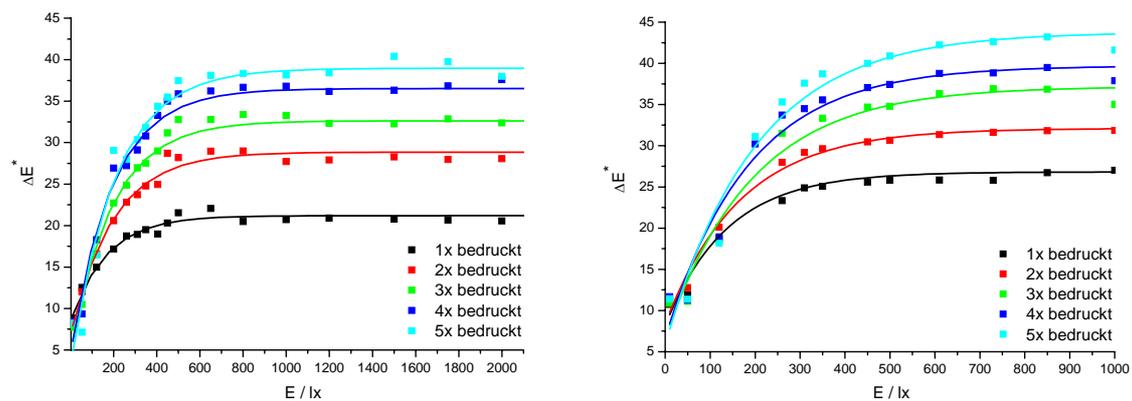


Abb. 44: Induzierbarer Farbabstand ΔE^* / Photochromie der BR-Tampondruckfarbe auf Glossy (links) und Papier (rechts) für verschiedene Druckstärken als Funktion der Beleuchtungsstärke E (Glühlampe, 60% rLF, Lichtart D65/10°).

Abb. 44 zeigt den induzierbaren Farbabstand als Funktion der Beleuchtungsstärke unter Glühlampenlicht für verschiedene Druckstärken. Gemäß der Abhängigkeit von der relativen Luftfeuchte für die unterschiedlichen Bedruckstoffe (siehe Abb. 43) werden für die jeweiligen Druckstärken im Vergleich zwischen Glossy und Papier unterschiedliche Farbabstände erreicht. Deutlich zeigt sich, dass bereits bei einer Beleuchtungsstärke von 1000 lx Glühlampenlicht der maximal induzierbare Farbabstand erreicht wird.

Im Folgenden wurde die Relaxationskinetik der Tampondrucke untersucht. Ausgehend von dem zuvor postulierten vereinfachten Photozyklus (siehe Kapitel 5.2.1.2) wird postuliert, dass die Geschwindigkeit der Relaxation 1. Ordnung im Bezug auf die Konzentration an M_{410} ist. Somit ergibt sich für den photoinduzierten Übergang von $M_{410} \rightarrow B_{570}$ das folgende hypothetische Geschwindigkeitsgesetz:

$$\frac{d[M_{410}]}{dt} = -k_M [M_{410}] \quad (37)$$

mit $[M_{410}]$ Konzentration an M_{410}
 t Zeit
 k_M Reaktionskonstante

Analog zu Kapitel 5.2.3.3.1 lässt sich das Geschwindigkeitsgesetz umformen:

$$\ln\left(\frac{[M_{410}]}{[M_{410}]_0}\right) = -k_M t \quad (38)$$

mit $[M_{410}]_0$ Konzentration an M_{410} zum Zeitpunkt $t = 0$ s

$$\ln\left(\frac{OD_{410}^* \varepsilon_{410}}{OD_{410/0}^* \varepsilon_{410}}\right) = -k_M t \quad (39)$$

mit OD_{410}^* Optische Dichte bei $\lambda = 410$ nm
 $OD_{410/0}^*$ Optische Dichte bei $\lambda = 410$ nm zum Zeitpunkt $t = 0$ s
 ε_{410} Extinktionskoeffizient bei $\lambda = 410$ nm

Eine Analyse der Messdaten vom Handmessgerät zur Reflektion der Drucke bei 400 nm und 420 nm zeigt ein sehr schlechtes Signal-Rausch-Verhältnis. Deshalb wurden die Messdaten zur optischen Dichte bei $\lambda = 560$ nm zur Berechnung einer fiktiven optischen Dichte bei $\lambda = 410$ nm herangezogen. Hierbei gilt zu allen Zeitpunkten $[M_{410}]_0 = [M_{410}] + [B_{570}]$, da die Anfangskonzentration von M_{410} gleich $[M_{410}]_0$ ist und näherungsweise zu Beginn der Relaxation kein B_{570} vorliegt. Da M_{410} vollständig zu B_{570} relaxiert, gilt weiterhin $[M_{410}]_0 = [B_{570}]_\infty$. Somit ergibt sich:

$$\ln \left(\frac{(OD_{560/\infty}^* - OD_{560}^*) \frac{\varepsilon_{410}}{\varepsilon_{560}}}{OD_{560/\infty}^* \frac{\varepsilon_{410}}{\varepsilon_{560}}} \right) = -k_M t \quad (40)$$

mit OD_{560}^* Optische Dichte bei $\lambda = 560$ nm
 $OD_{560/\infty}^*$ Optische Dichte bei $\lambda = 560$ nm zum Zeitpunkt $t = \infty$ s
 $OD_{560/0}^*$ Optische Dichte bei $\lambda = 560$ nm zum Zeitpunkt $t = 0$ s
 ε_{560} Extinktionskoeffizient bei $\lambda = 560$ nm

$$\ln(OD_{560/\infty}^* - OD_{560}^*) = -k_M t + \ln OD_{560/\infty}^* \quad (41)$$

Wie Gleichung (41) zeigt, ist für die Relaxationsreaktion $M_{410} \rightarrow B_{570}$ (pseudo-erster Ordnung) bei Auftragung von $\ln(OD_{560/\infty}^* - OD_{560}^*)$, im Folgenden $\ln OD_{410}^*$ genannt, gegen t eine Gerade mit der Steigung $-k$ zu erwarten.

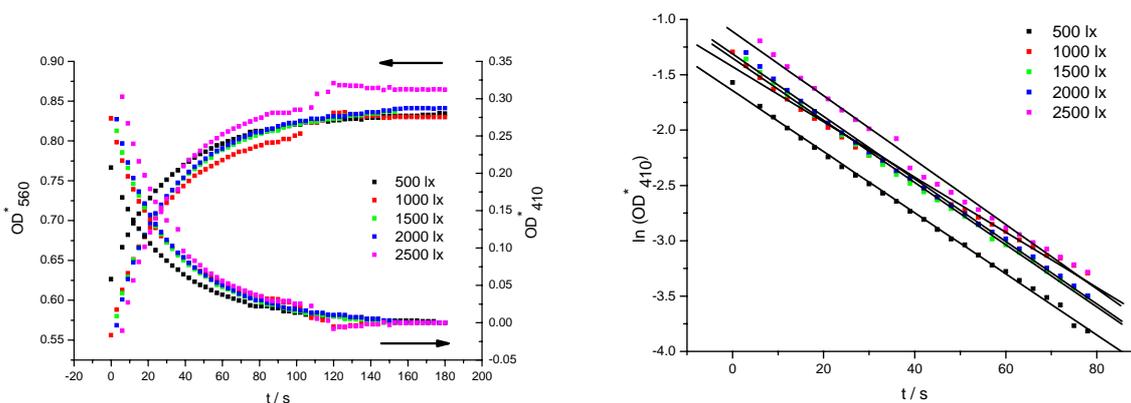


Abb. 45: Relaxationskinetik eines fünffach Drucks der BR-Tampondruckfarbe auf Glossy für verschiedene Beleuchtungsstärken (Glühlampe, 60 % rLF, Detektion bei $\lambda = 560$ nm, transformiert nach $\lambda = 410$ nm).

Abb. 45 (rechts) zeigt einen linearen Zusammenhang des Reaktionsverlaufs für das Zeitintervall von 0 % bis ca. 90 % bezogen auf den Logarithmus der M_{410} -Konzentration. Für den Zeitraum > 90 % zeigt sich im Vergleich eine veränderte Relaxationskinetik. Hier in der Nähe des Gleichgewichts zwischen B_{570} und M_{410} wird neben der Relaxation (Hinreaktion) auch die photochemische Bleichung (Rückreaktion), hervorgerufen durch das für die Messung unabdingbare Licht (siehe Kapitel 3.3.4), dominant und das vereinfachte Geschwindigkeitsgesetz aus Gleichung (38) verliert seine Gültigkeit. Für die kinetische

Beschreibung des Relaxationsvorgangs, wie er von einem Betrachter wahrgenommen wird, ist dies allerdings irrelevant, da im Zeitraum $> 90\%$ nur noch minimale Konzentrationsänderungen erfolgen und damit die abmusterbare Farbänderung vernachlässigbar klein ist.

Tab. 21: Geschwindigkeitskonstante k_M des Relaxation der BR-Tampondruckfarbe auf Glossy für verschiedene Beleuchtungsstärken unter Glühlampenlicht bei 60 % rLF.

Beleuchtungsstärke / lx	Glossy	
	$k_M / s^{-1}lx^{-1}$	Standardfehler / $s^{-1}lx^{-1}$
500	0.02759	0.00024
1000	0.02493	0.00043
1500	0.02810	0.00026
2000	0.02825	0.00029
2500	0.02907	0.00053

Im Rahmen der Variation der Druckstärke durch den nicht exakt reproduzierbaren Farbübertrag beim Tampondruck, zeigt sich, dass die Geschwindigkeit des Relaxationsvorgangs keine Funktion der zur Erzeugung des Ausgangszustandes verwendeten Beleuchtungsstärke und damit der Ausgangskonzentration $[M_{410}]$ darstellt.

Im Folgenden wurde die Relaxationskinetik als Funktion der Druckstärke und der relativen Luftfeuchtigkeit für auf Glossy und Papier untersucht (siehe Abb. 46 bis Abb. 48).

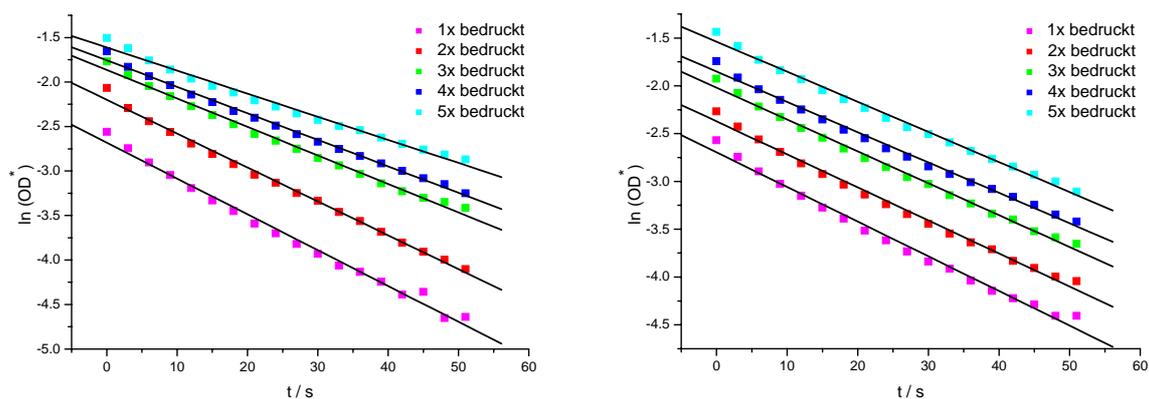


Abb. 46: Relaxationskinetik der BR-Tampondruckfarbe auf Glossy (links) und Papier (rechts) für verschiedene Druckstärken (Glühlampe $E = 1000$ lx, 60 % rLF, Detektion bei $\lambda = 560$ nm, transformiert nach $\lambda = 410$ nm).

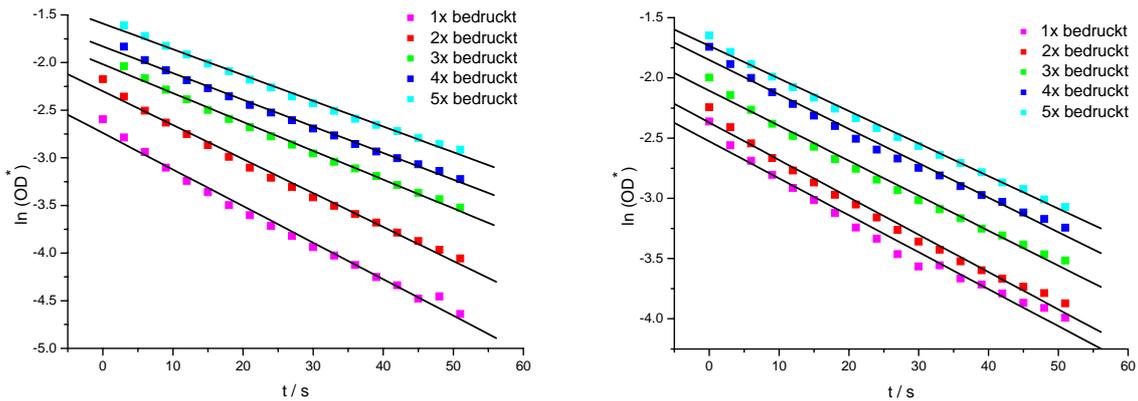


Abb. 47: Relaxationskinetik der BR-Tampondruckfarbe auf Glossy (links) und Papier (rechts) für verschiedene Druckstärken (Glühlampe $E = 1000 \text{ lx}$, 40 % rLF, Detektion bei $\lambda = 560 \text{ nm}$, transformiert nach $\lambda = 410 \text{ nm}$).

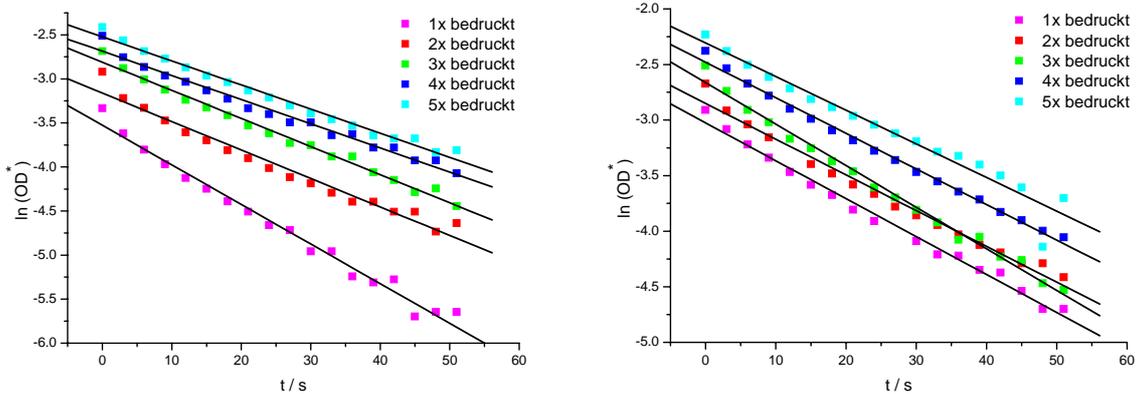


Abb. 48: Relaxationskinetik der BR-Tampondruckfarbe auf Glossy (links) und Papier (rechts) für verschiedene Druckstärken (Glühlampe $E = 1000 \text{ lx}$, 15 % rLF, Detektion bei $\lambda = 560 \text{ nm}$, transformiert nach $\lambda = 410 \text{ nm}$).

Es zeigt sich ebenfalls ein linearer Zusammenhang für $\ln(\text{OD}^*)$ als Funktion der Zeit t für das Zeitintervall von 0 % bis ca. 90 % des Reaktionsverlaufs. Die sich aus den linearen Regressionen als Steigung ergebenden Reaktionskonstanten $-k_M$ als Funktionen der Druckstärke und der relativen Luftfeuchtigkeit sind in Abb. 49 dargestellt.

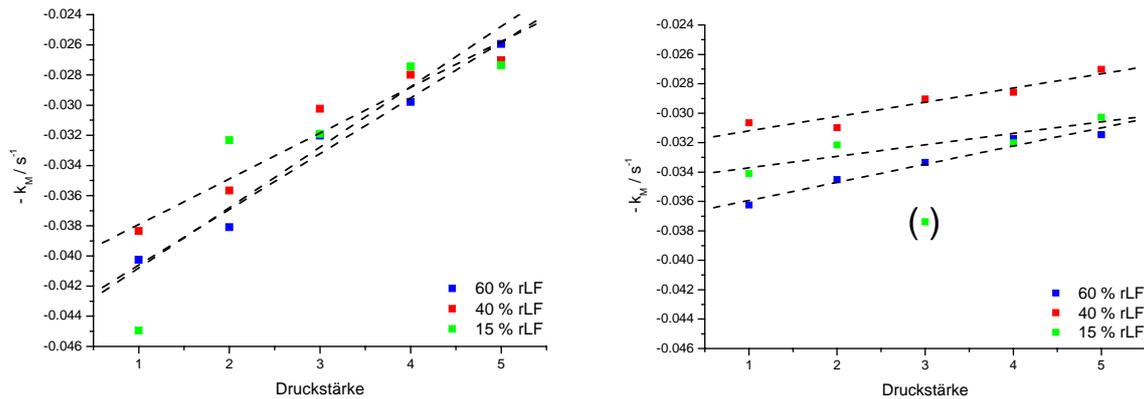


Abb. 49: Geschwindigkeitskonstante $-k_M$ der BR-Tampondruckfarbe auf Glossy (links) und Papier (rechts) als Funktion der Druckstärke für verschiedene relative Luftfeuchtigkeiten unter Glühlampenlicht ($E = 1000 \text{ lx}$).

Zur Verdeutlichung wurden durch lineare Regression erhaltene Hilfslinien als "eye-guiding lines" in die Abb. 49 eingefügt. Es zeigt sich für Glossy, dass die Geschwindigkeit der Relaxationreaktion mit steigender Druckstärke stark abnimmt. Wie zuvor diskutiert führt die Beschichtung der Glossyoberfläche zu einer Veränderung der Bleichbarkeit (siehe Abb. 43) und der Bleichkinetik (siehe Tab. 18). Für die Druckstärken dreifach bis fünffach werden für Glossy und Papier ähnliche Relaxationskinetiken erhalten. Erst bei Druckstärken $<$ dreifach zeigt sich der geschwindigkeitssteigernde Effekt der basischen bzw. wasserspeichernden Glossyoberfläche auf die Kinetik der Relaxationreaktion. Die Relaxationsgeschwindigkeit ist für den Bedruckstoff Papier eine wesentlich weniger stark ausgeprägte Funktion der Druckstärke.

Im Folgenden wurde der kinetische Verlauf des Bleichvorgangs im CIELAB Farbraum untersucht (siehe Abb. 50). Es zeigt sich, dass neben dem Bleichverhalten auch das kinetische Relaxationsverhalten von L^* , a^* und b^* als Funktion der Zeit mittels einer Exponentialfunktion erster Ordnung angenähert werden kann (siehe Gleichung (36)).

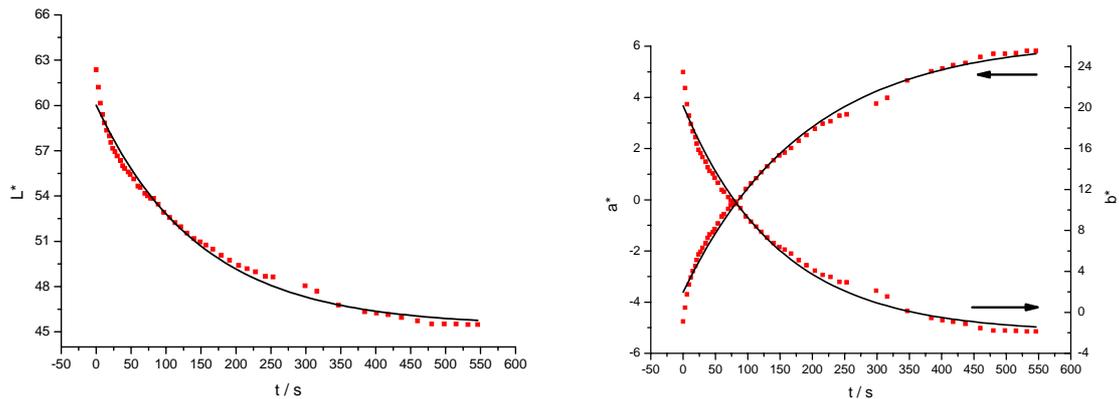


Abb. 50: Zeitlicher Verlauf von L^* , a^* und b^* beim thermischen Übergang $M_{410} \rightarrow B_{570}$ eines fünffach Drucks der BR-Tampondruckfarbe auf Papier (Glühlampe $E = 1000 \text{ lx}$, $60 \% \text{ rLF}$, Lichtart $D65/10^\circ$).

In Abb. 51 ist der Verlauf der Farbveränderung im CIELAB-Farbraum für den Relaxationsvorgang dargestellt. In den Spektrum verläuft der Relaxationsvorgang zeitlich von kleinem a^* und großem b^* & L^* Werten (rechts oben in der Abb.) zu großem a^* und kleinen b^* & L^* Werten (links unten in der Abb.) (siehe Abb. 50). Zum gemessenen Farbverlauf im LAB-Farbraum gelten die gleichen Überlegungen wie zu Abb. 42. Letztendlich müssen beim Bleich- und Relaxationsvorgang die gleichen Mischfarben im CIELAB-Farbraum eingenommen werden. Nur die zeitliche Verweildauern der jeweiligen Farben unterscheiden sich beim Bleichvorgang von lila nach gelb bzw. beim Relaxationsvorgang von gelb nach lila.

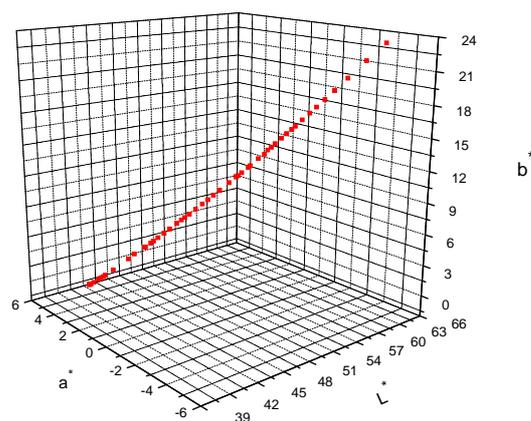


Abb. 51: Verlauf von L^* , a^* und b^* beim thermischen Übergang $M_{410} \rightarrow B_{570}$ eines fünffach Drucks der BR-Tampondruckfarbe auf verschiedenen Substraten (Glühlampe $E = 1000 \text{ lx}$, $60 \% \text{ rLF}$, Lichtart $D65/10^\circ$).

5.2.3.4 Lichteinheit

Die Quantifizierung der Lichteinheit der Druckerzeugnisse auf Basis der BR-Tampondruckfarbe wurde in einem Belichtungsgerät vom Typ XLS+ (ATLAS, Gelnhausen) durchgeführt. Zur Normierung wurde ein Lichteinheitsmaßstab (Blauwollskala) mitbelichtet (siehe Kapitel 3.3.5). Zur Charakterisierung der Lichteinheit wurden zeitaufgelöste UV/vis-Reflektionsspektren und Farbmessungen mittels eines Handmessgeräts vom Typ Color-Guide 45/0 (BYKGardener, Geretsried) aufgenommen (siehe Kapitel 3.3.4). Die Prüfung der Lichteinheit anhand des gemessenen Farbunterschiedes kann als exakt angesehen werden und ist der oft üblichen rein visuellen Prüfung anhand eines Graumaßstabs vorzuziehen ^[119]. Die Lichteinheit der photochromen BR-Tampondruckfarbe wurde nur auf dem Bedruckstoff Papier untersucht, da sich bei Bestrahlung der reinen Glossyoberflächen irreversible Verfärbungen zeigten, die zu Messartefakten führten.

Im Allgemeinen wird die Degradation von Farben durch die energiereiche UV-Strahlung hervorgerufen. Der UV-Anteil der Sonnenstrahlung beginnt bei $\lambda = 400$ nm und endet bei $\lambda = 293$ nm durch Absorption der kurzwelligeren Strahlung durch die Atmosphäre. Ziel der Untersuchungen war es zunächst die Zerstörungsschwelle der erzeugten Drucke zu bestimmen. Hierzu wurden die Drucke durch verschiedene Filter mit steigendem "Cut-off" belichtet (siehe Abb. 52).

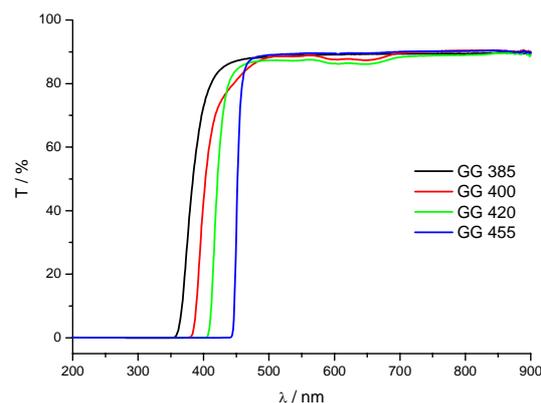


Abb. 52: Transmissionsverhalten T verschiedener Glasfilter als Funktion der Wellenlänge λ (Schott, Mainz).

Abb. 53 zeigt Reflektionsspektren von fünffach Drucken der Tampondruckfarbe auf Papier vor und nach mehreren Belichtungszyklen mit einer Dosis von je $D = 10$ MJ/cm². Deutlich ist für den Versuch ohne Filter die Abnahme der optischen Dichte bei ca. $\lambda = 560$ nm zu

erkennen. Es erfolgt also eine Degradation des B_{570} -Zustands des BR. Die Bildung eines dedizierten Photoproduktes durch die UV-Bestrahlung konnte im messbaren spektralen Bereich ($400 \text{ nm} < \lambda < 700 \text{ nm}$) nicht beobachtet werden. Für die Bestrahlung mit dem GG455-Filter wurde hingegen nur noch eine leichte Degradation der B_{570} -Bande beobachtet.

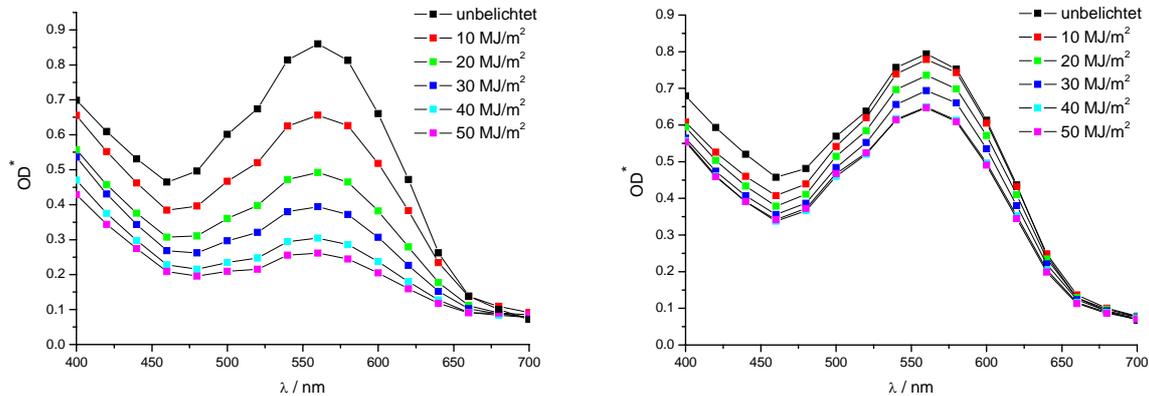


Abb. 53: Lichtechtheit eines fünffach Drucks der BR-Tampondruckfarbe auf Papier für verschiedene Filter als Funktion der Wellenlänge λ (Links: kein Filter, rechts GG455).

Im Folgenden wurde die relative OD^* bei $\lambda = 560 \text{ nm}$ als Maß für die Degradation der Druckfarbe herangezogen (siehe Abb. 54).

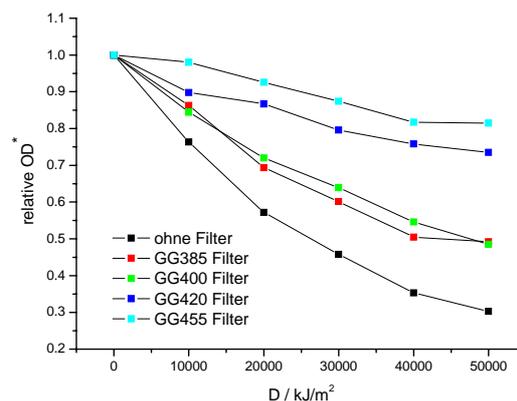


Abb. 54: Lichtechtheit eines fünffach Drucks der BR-Tampondruckfarbe auf Papier für verschiedene Filter als Funktion der Belichtungs-dosis D (Detektion bei $\lambda = 560 \text{ nm}$).

Für die Belichtung ohne Filter zeigt sich die stärkste Degradation der Farbe, eine etwas bessere Beständigkeit wird für die Filter GG385 und GG400 erreicht. Eine hohe Lichtechtheit

wird für die Filter GG420 und GG455 erhalten. Die Abb. 54 legt nahe, dass es mehrere wellenlängeabhängige Schwellen für die Degradation von BR durch Bestrahlung gibt.

Die Photodegradation von BR in Suspensionen durch harte UV-Strahlung ($\lambda = 254 \text{ nm}$) wurde bereits zuvor untersucht ^[120]. Hier wird postuliert, dass durch Absorption eines Photons durch eine Aminosäure des Proteingerüsts ein Radikal generiert wird. Durch Elektronentransfer wird das Radikal auf ein Thryptophan übertragen. Prinzipiell ist auch denkbar, dass das Radikal direkt photochemisch im Thryptophan generiert wird. Dieses Radikal führt dann in der Reaktion mit dem Retinal zur Photodegradation des BR.

Für den spektralen Bereich $\lambda < 300 \text{ nm}$ der UV-Strahlung kann ein ähnlicher Prozess auch für die Photodegradation des BR in Drucken angenommen werden. Hier erfolgt die Absorption der Strahlung innerhalb der UV-Bande der Aminosäuren. Für den Bereich $300 \text{ nm} < \lambda < 450 \text{ nm}$ erfolgt die Absorption der UV-Strahlung innerhalb der Bande des M₄₁₀-Intermediats. Die in diesem Bereich beobachtete Degradation muss nach einem anderen Mechanismus erfolgen. Arbeiten zur Photodegradation von BR in Suspension zeigten ebenfalls eine ähnliche Zerstörungsschwelle für den Bereich $\lambda > 300 \text{ nm}$ ^[121].

Wie zuvor im Anforderungsprofil beschrieben soll die Lichtechtheit der zu entwickelnden Farbe mindestens auf dem Niveau anderer Sicherheitsdruckfarben, wie z.B. den Leuchtdruckfarben, liegen (siehe 5.2.2.1). Bezogen auf die Blauwollskala BWS bedeutet dies eine Lichtechtheit von $BWS \geq 3$. Zur Erhöhung der Lichtechtheit von Druckfarben können zwei Strategien verfolgt werden. Zum einen die Beimengung von Lichtschutzmitteln zur Druckfarbe, zum anderen die Beschichtung der Druckoberfläche mit einem Lichtschutzmittel enthaltenden Lack oder durch Lamination mit einer UV-absorbierenden Polymerfolie ^[122, 123]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der letztere Ansatz verfolgt:

1. Aufrakeln einer Lackschicht aus dem Lichtschutzmittel Tinuvin 900 (Ciba, Lampertheim) (10 % aus Toluol) (siehe Kapitel 3.2.1).

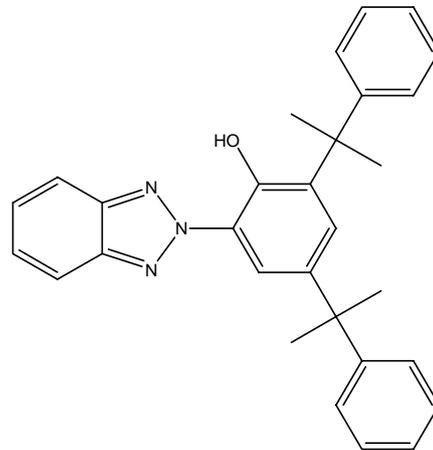


Abb. 55: Strukturformel von Tinuvin 900 (Ciba, Lampertheim), 2-(2H-Benzotriazol-2-yl)-4,6-bis(1-methyl-phenylethyl)phenol, CAS 70321-86-7.

2. Heisslamination der Oberfläche mit einem Polypropylen-Polyethylen-Mischpolymer-Laminat vom Typ PERFEX Crystal Clear Laminating Film (d = 125 µm, GMP, Polch) in einem Laminiergerät vom Typ PE-Photonex 175LSI (T = 100°C, speed 1, GMP, Polch).

Die Funktionsweise von Lichtschutzmitteln lässt sich in 3 Strategien einteilen ^[53]:

1. Absorption der schädlichen Strahlung
2. Löschung der angeregter Zustände durch Quenchen
3. Abfangen von bei der Belichtung gebildeten Radikalen

Die hier verwendeten Lichtschutzmittel funktionieren durch Absorption von Strahlung (siehe Abb. 56):

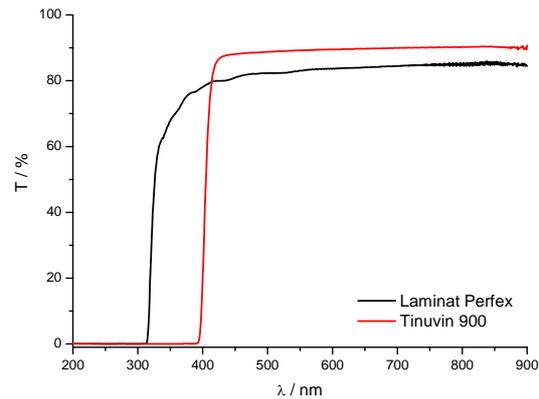


Abb. 56: Transmissionsverhalten T der UV-Schutzversiegelungen als Funktion der Wellenlänge λ .

Das Transmissionsverhalten der Tinivin 900 Beschichtung ähnelt dem des GG 420 Filters. Die Absorption des Laminats setzt bei $\lambda = 320$ nm ein und also im Vergleich wesentlich zu kleineren Wellenlängen verschoben.

Im Folgenden wurde die Lichtechtheit von Drucken der BR-Tampondruckfarbe auf Papier ohne und mit den unterschiedlichen UV-Schutzversiegelungen der Oberfläche untersucht.

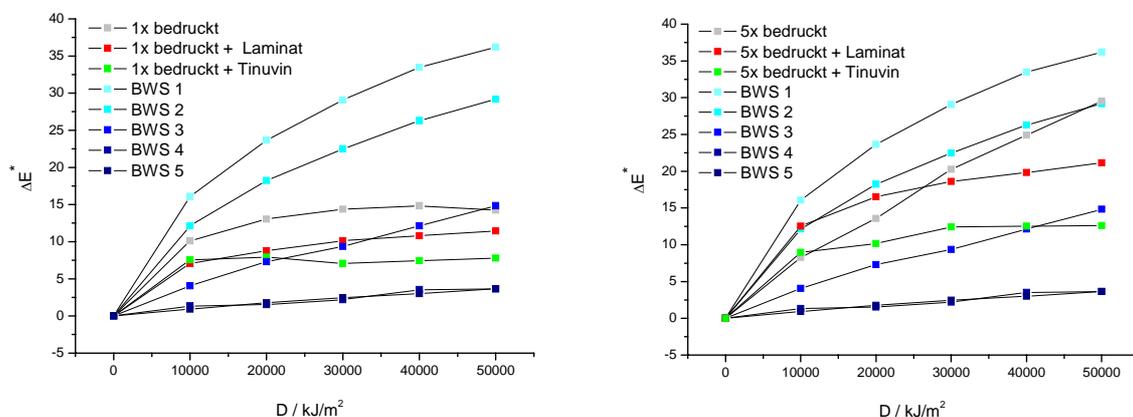


Abb. 57: Lichtechtheit von Drucken der BR-Tampondruckfarbe mit verschiedenen UV-Schutzversiegelungen auf Papier als Funktion der Belichtungs-dosis D mit Bezug zum Blauwollstandard BWS (Lichtart D65/10°) Links: 1x bedruckt, rechts: fünffach bedruckt.

Deutlich ist in Abb. 57 die Zunahme des Farbabstands ΔE^* für die belichteten Proben bezogen auf den unbelichteten Zustand als Funktion der Belichtungs-dosis D zu sehen. Für den einfachen Druck liegen die Farbabstände der unterschiedlichen Beschichtungen relativ nah zusammen. Deutlich zeigen sich hingegen beim fünffachen Druck die unterschiedlichen

Einflüsse der Beschichtungen. Die ähnlichen Farbabstände bei geringen Druckstärken lassen sich auf die Transparenz der Drucke zurückführen. Verfügt der Druck durch geringe Druckstärke über eine Resttransparenz, wird bei der Farbmessung zwangsläufig zu einem Anteil das Papierweiß mit einbezogen. Dieser feste Farbanteil führt zu einer Minderung des messbaren Farbabstands.

Weiterhin zeigt sich für alle Messungen ein bei geringen Belichtungs Dosen D schnell ansteigender Farbabstand ΔE^* der BR-Drucke im Vergleich zum Blauwollstandard. Die Kurve verläuft dann allerdings bei höheren Belichtungs Dosen D flacher als die der BWS.

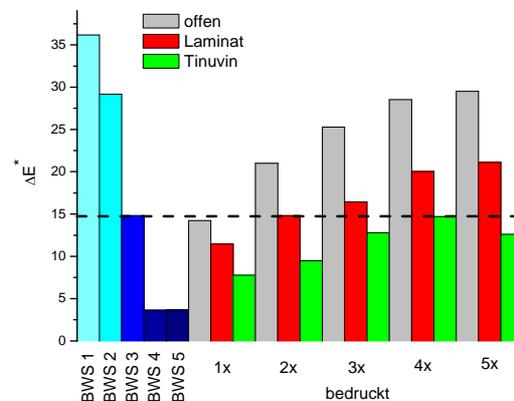


Abb. 58: Lichtechtheit von Drucken der BR-Tampondruckfarbe mit verschiedenen UV-Schutzversiegelungen auf Papier mit Bezug zum Blauwollstandard BWS (Lichtart D65/10°, $D = 50 \text{ MJ/m}^2$) Links: Einfach bedruckt. Rechts: Fünffach bedruckt.

Ein Vergleich für unterschiedliche Druckstärken zeigt deutlich, dass bei einer Belichtungs Dosis von $D = 50 \text{ MJ/m}^2$ die mit Tinuvin 900 beschichteten Drucke alle die geforderte Lichtechtheit von $BWS \geq 3$ erreichen (siehe Abb. 58). Eine Beschichtung mit Tinuvin 900 stellt also eine geeignete Methode zur Erhöhung der Lichtechtheit der photochromen BR-Drucke dar.

5.2.4 Zusammenfassung

Basierend auf den photochromen Eigenschaften von BR wurde eine Tampondruckfarbe entwickelt und evaluiert. Ausgangspunkt hierfür bildete ein Anforderungsprofil, das für die Druckfarbe formuliert wurde. Entsprechend des Profils wurden geeignete Komponenten als Binde-, Lösungs- und Netzmittel ausgewählt und in einem iterativen Prozess eine Basistampondruckfarbe durch Adaption des rheologischen Verhaltens an eine kommerzielle Referenzfarbe entwickelt. Ausgehend von dieser Basis wurde die Druckfarbe in weiteren iterativen Prozessen bezüglich hoher Pigmentierung, Auflösung, Druckbild und Photochromie optimiert. Im Folgenden wurden die Einflussfaktoren auf die Photochromie der Drucke diskutiert und sowohl durch genetische Modifikation des Proteins, als auch durch Veränderung der chemischen Umgebung im Druck die Photochromie entsprechend den zuvor definierten Zielparametern für den Einsatz als photochromes OVD angepasst. Die erzeugten Drucke wurden bezüglich ihres kinetischen Bleich- und Relaxationsverhaltens und ihres Farbstands charakterisiert. Hierbei zeigte sich für die Bleichkinetik ein Verhalten 1. Ordnung bezüglich der Lichtintensität und der OD in Reflektion (OD^*) und für die Relaxationskinetik ein Verhalten 1. Ordnung bezüglich der OD^* . Im Rahmen der Untersuchungen wurde der Einfluss von Lichtintensität, Strahlungsquelle, Druckstärke, Bedruckstoff und Luftfeuchtigkeit untersucht und interpretiert. Zusammenfassend stützen die durchgeführten kinetischen Messungen das zuvor postulierte Zweizustandsmodell des BR-Photozyklus. Weiterhin wurden zur quantitativen Beschreibung des menschlichen Farbeindrucks kinetische und statische Messungen an den Drucken im CIELAB-Farbraum durchgeführt. Für die Drucke wurde die spektrale Abhängigkeit der Lichtechtheit untersucht und durch das Lichtschutzmittel Tinuvin 900 konnte eine befriedigende Lichtechtheit von $BWS \geq 3$ erreicht werden.

Zusammenfassend wurde eine photochrome Druckfarbe entwickelt, die über eine Prozessierbarkeit auf industriellen Druckmaschinen verfügt, eine gut abmusterbare Photochromie über einen breiten Anwendungsbereich zeigt und über eine befriedigende Lichtechtheit verfügt.

5.3 BR als optischer Datenspeicher

5.3.1 Einleitung

Wie bereits eingangs beschrieben stellt Bakteriorhodopsin eine licht-gesteuerte Protonenpumpe dar. Nach Absorption eines Photons durchläuft das Protein einen komplexen Photozyklus, der durch verschiedene Intermediate gekennzeichnet ist [35].

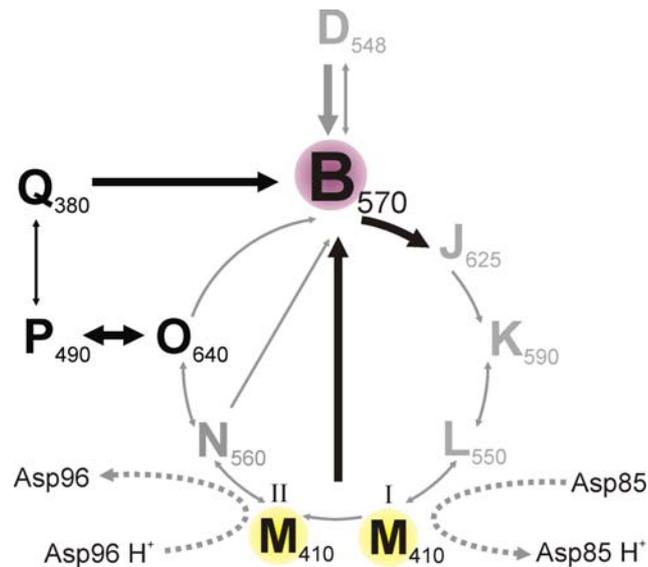


Abb. 59: Um Intermediate der optischen Datenspeicherung erweiterter *trans*-Photozyklus des BR. Die Intermediate sind mit Großbuchstaben bezeichnet, deren Index das jeweilige Absorptionsmaximum angibt. Dicke Pfeile stehen für photochemische, dünne Pfeile für thermische Übergänge.

Das allgemein anerkannte Modell für den Photozyklus ist in Abb. 59 dargestellt. Durch Absorption eines Photons wird der Grundzustand B₅₇₀ durch eine photochemische Reaktion in das J₆₂₅ Intermediat umgewandelt, das dann in einer zyklischen Folge von thermischen Umwandlungen gefolgt wieder zum Grundzustand B₅₇₀ zurückkehrt.

Basierend auf dem photochromen Shift im Photozyklus zwischen B₅₇₀ und M₄₁₀, wurden viele mögliche technische Anwendungen im Bereich der optischen Datenspeicherung und Verarbeitung mittels BR in der Literatur beschrieben [5, 8, 10]. Als erstes kommerzielles Endprodukt wurde auf Basis von photochromen BR-Filmen in der AG Hampp der FringeMaker-plus[®], eine kompakte holographische Interferometrikamera entwickelt, die für die kontaktlose, nicht destruktive Materialprüfung und Schwingungsanalyse eingesetzt werden kann [124]. Allerdings sind die photochromen Eigenschaften nur zur

Kurzzeitdatenspeicherung geeignet, da zum einen die am Prozess beteiligten Intermediate nicht thermisch stabil sind und zum anderen der optische Leseprozess immer mit einer Minderung der Datenintegrität verbunden ist (siehe Kapitel 5.2.1.2).

Für die reversible Langzeitdatenspeicherung wird ein Prozess über zwei sequenzielle Einphotonenreaktionen beschrieben^[125-127]. Wobei durch die erste Photoreaktion der normale Zyklus initiiert wird und in einem zweiten Schritt durch Absorption eines Photons von O₆₄₀ das P₄₉₀ Intermediat gebildet wird, das wiederum thermisch zum Q₃₈₀ Intermediat übergeht. Sowohl das P₄₉₀ als auch das Q₃₈₀ zeigen eine *9-cis* Retinalkonfiguration und sind thermisch stabil gegenüber dem Übergang zu den *13-cis* Zuständen O₆₄₀ und B₅₇₀. Die Rückkehr in den konventionellen Photozyklus kann somit nur durch einen photochemischen Schritt erfolgen. Das Hauptproblem dieses Prozesses liegt in der niedrigen Quantenausbeute von weit unterhalb 1% für den Schreibprozess.

Im Rahmen dieser Arbeit soll ein neuartiges Konzept zur optischen Langzeitdatenspeicherung in BR-Filmen vorgestellt werden. Es zeigt sich, dass durch Bestrahlung mit energiereichen Laserpulsen ein permanenter Farbwechsel in BR-Filmen hervorgerufen werden kann^[128]. Basierend auf dieser Farbänderung soll ein optischer WORM Speicher, also ein einmal beschreibbarer und mehrfach auslesbarer Datenspeicher - vergleichbar einer CD-R, entwickelt werden^[129, 130]. Durch die Vereinigung des Konzepts von Bakteriorhodopsin als photochromes Pigment mit der hier vorgestellten optischen Langzeitdatenspeicherung, ergibt sich dann ein multifunktionales Sicherheitskonzept auf der Basis des BR-Pigments^[131, 132].

5.3.2 Methoden der optischen Datenspeicherung

5.3.2.1 Filmerzeugung

Für die Datenspeicherung in BR ist die Fixierung der PM-Fragmente essentiell^[133]. Nur durch Unterbindung der Translations- und Rotationsdiffusion kann eine Datenintegrität gewährleistet werden. Die Immobilisierung der BR-Pigmente erfolgt durch Einbettung in Polymere. Die in den folgenden Untersuchungen verwendeten BR-Filme basieren, falls nicht explizit anders erwähnt, auf einer Gelatinematrix^[134] (Photogelatine) und wurden mittels Rakelverfahren hergestellt^[52] (siehe Kapitel 3.2.1). Auf Zusätze zur Einstellung der Photochromie wurde, falls nicht anders erwähnt, verzichtet.

5.3.2.2 Generierung der Photoprodukte

Zur Generierung der Photoprodukte wurden unterschiedliche Lasersysteme verwendet:

- N Methode N:** Zur Erzeugung von Pulslängen im ns-Bereich wurde eine Nd:YAG Laser vom Typ Infinity 40-100 ($\lambda = 532 \text{ nm}$, flat-top-Pulsprofil, 3 ns Pulslänge, linear polarisiert, Coherent, Dieburg) verwendet. Die Energie im Puls und die Pulsanzahl konnte direkt am Gerät eingestellt werden.
- F Methode F:** Ausgehend von einem Ti:Sapphir-Oscillator mit regenerativem Verstärker wurde ein 80 fs Puls erzeugt und durch Frequenzkonversion mittels eines non-collinear optical parametric amplifier (NOPA) ^[135] wurde ein durchstimmbarer fs-Puls (linear polarisiert) erhalten. Die Pulsenergie wurde durch Verwendung von Graufiltern (Schott, Mainz) eingestellt. Die Pulsanzahl wurde mittels eines Choppers und eines Photoverschlusses kontrolliert (siehe Abb. 60).

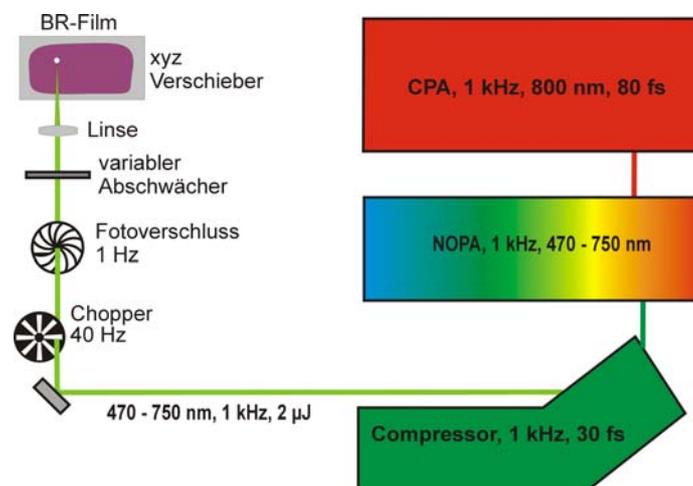


Abb. 60: Aufbau des Lasersystems zur Erzeugung von fs-Pulsen (AG Prof. Zinth, LMU München).

Die exakte Energie der Laserpulse wurde mit geeigneten Messgeräten, wie z.B. dem Fieldmaster GS (Coherent, Dieburg) durch Auskopplung aus dem Puls bestimmt.

5.3.2.3 UV/vis-spektroskopische Charakterisierung der Photoprodukte

Zur UV/vis-spektroskopischen Charakterisierung wurden neben einem Benchtopgerät vom Typ Kontron 922 (siehe Kapitel 3.6.1) (**Methode 1**) auch je nach Mess- und Spektralbereich verschiedene Faserspektrometer eingesetzt:

- 2 **Methode 2:** Vis-Spektren im Bereich $400 \text{ nm} \leq \lambda \leq 800 \text{ nm}$ wurden mit einem fasergekoppelten CCD-Spektralphotometer vom Typ Instaspec IV (Oriel, Darmstadt) aufgezeichnet. Als Lichtquelle wurde eine Xenonlampe vom Typ Xe lamp 60 000 series (Oriel, Darmstadt) benutzt. Die Ausgangsleistung wurde durch Verwendung von Graufiltern abgeschwächt, um Photochromie im Film zu verhindern.
- 3 **Methode 3:** Spektroskopische Messungen im visuellen Bereich $400 \text{ nm} \leq \lambda \leq 1000 \text{ nm}$ wurden mit dem zuvor beschriebenen Farbmesssystem (Nikon, Düsseldorf) durchgeführt (siehe Kapitel 3.3.4).
- 4 **Methode 4:** Für spektroskopische Untersuchungen im Bereich $250 \text{ nm} \leq \lambda \leq 800 \text{ nm}$ wurde ein Mikroskop-Spektralphotometer vom Typ UMSP-80 (Zeiss, Oberkochen) kombiniert mit einem Diodenarrayspektrometer vom Typ TDAS (J & M Analytische Mess- und Regeltechnik, Aalen) verwendet. Als Lichtquellen dienten eine stabilisierte Xenonhochdrucklampe vom Typ XBO 75W (Osram, München) und eine Halogenlampe vom Typ HBO 100W (Osram, München).

Die Messmethode 2 wurde für Messspots $\geq 3 \text{ mm}$ Durchmesser und die Methoden 3 & 4 für Spots $\geq 10 \mu\text{m}$ & $\leq 3 \text{ mm}$ verwendet. Bei den Methoden 3 & 4 konnte aufgrund der geringen Spotgröße und der damit benötigten hohen Lichtintensität für die Detektion die Photochromie des Films nicht vollständig unterdrückt werden.

Zur monochromatischen OD-Bestimmung des B_{570} -Grundzustands wurden verschiedene Methoden verwandt:

- 5 **Methode 5:** Mikroskopische OD-Bestimmungen wurden mit einem Mikroskop vom Typ H 600 AM 50 (Hund, Wetzlar, Germany) ausgestattet mit einem Bandpassfilter ($\lambda = 568 \text{ nm}$), und einer Monochrom-CCD-Kamera vom Typ Orca C4742-95 (Hamamatsu, Herrsching am Ammersee). Die Intensität des Untergrunds und des

Maximums wurden in Werten zwischen 0 und 255 durch Profilierung der mit der Kamera aufgezeichneten Bilder erhalten. Die OD-Änderung konnte aufgrund des linearen Ansprechverhaltens der Kamera wie folgt berechnet werden:

$$\Delta OD = \log\left(\frac{I_0}{I_{max}}\right) \quad (42)$$

mit I_0 Intensität des Untergrunds
 I_{max} Intensität im Maximum

- 6 **Methode 6:** Für größere Messspots wurde die OD durch Abschwächung eines Laserstrahls beim Durchgang durch die Probe bestimmt. Hierzu wurde ein Nd:YVO₄ CW Laser vom Typ Verdi ($\lambda = 532$ nm, Coherent, Dieburg) und eine Photodiode verwendet. Die Ausgangsleistung des Lasers wurde durch Verwendung von Graufiltern abgeschwächt, um Photochromie im Film zu verhindern. Die aus dem Intensitätsverhältnis berechnete OD wurde von $\lambda = 532$ nm nach $\lambda = 570$ nm durch Multiplikation mit einem Faktor von 1.29 konvertiert ($\epsilon_{568} = 63,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ & $\epsilon_{532} = 49,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für PM^[136]).

Zur Messung von UV/vis-Spektren als Funktion der Polarisation des Messlichts wurde für die Messmethoden 1-5 ein drehbarer linearer Polfilter bzw. für die Methode 6 eine $\lambda/2$ -Platte in den Strahlengang eingebracht. Die im Film induzierte Anisotropie wurde wie folgt berechnet:

$$\Delta OD_{||} = OD_{||0} - OD_{|| \text{ nach Laser}} \quad (43)$$

$$\Delta OD_{\perp} = OD_{\perp 0} - OD_{\perp \text{ nach Laser}} \quad (44)$$

$$OD_{||0} = OD_{\perp 0} =: OD_0 \quad (45)$$

$$A = \Delta OD_{||} - \Delta OD_{\perp} \quad (46)$$

$$DCF = A / OD_0 \quad (47)$$

mit	OD _{II}	OD bei gleicher Polarisation von Schreib- und Messlicht
	OD _I	OD bei orthogonaler Polarisation von Schreib- und Messlicht
	OD ₀	OD vor der Laserbelichtung
	A	Anisotropie
	DCF	Dichroismusfaktor

Im Folgenden werden der verwendete Laser und die Messmethode mit der entsprechenden Buchstaben-Zahlen-Kombination abgekürzt (z.B. N3 für Infinity-Laser und Nikon-Farbmesssystem). Falls die Messung als Funktion der Polarisation des Messlichts durchgeführt wurde, wird die Kombination um den Buchstaben P ergänzt (z.B. N3P).

5.3.2.4 Schreib- und Leseaufbauten zur optischen Datenspeicherung

Zur Speicherung von Datenstrukturen wurden Aufbauten sowohl für einen sequenziellen, als auch für einen parallelen Schreibvorgang von Daten entwickelt:

P Methode P: Für das parallele Schreiben von Daten wurde der Laserstrahl des Infinity 40-100 (Coherent, Dieburg) durch einen Beamexpander (BE) (x7) aufgeweitet und orts aufgelöst die Polarisation mittels eines "liquid crystal spatial light modulator" (LC-SLM) vom Typ LC Video Projector VP-100PS ($T_{532} = 31.3\%$, 320 pixel x 264 pixel, Appertur 26 mm x 20 mm, Epson, Meerbusch) moduliert. Der modulierte Strahl wurde dann mittels eines Beamkolimator (BC) (x1/8) kollimiert und trifft in der Bildebene (Bildgröße 3.2 mm x 2.6 mm) auf den BR-Film.

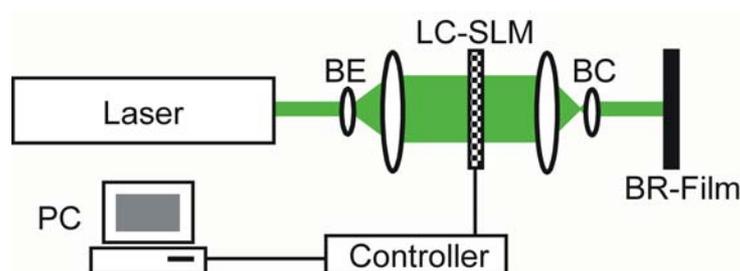


Abb. 61: Aufbau zur parallelen Datenspeicherung in BR-Filmen.

S Methode S: Für sequenzielle Schreibvorgänge wurde der Laserstrahl des Infinity 40-100 (Coherent, Dieburg) durch einen Beamkolimator (BE) kollimiert. Die Polarisation des Laserstrahls wurde mittels einer sich in einem automatischen Drehversteller vom Typ DMT65 (Owis, Staufen) befindenden $\lambda/2$ -Platte kontrolliert.

Die x,y-Position des Laserstrahls auf dem Film wurde durch Bewegung des Films mittels zweier Linearversteller vom Typ LM60 (Owis, Staufen) eingestellt. Die Ansteuerung des Lasers und der Versteller erfolgte durch einen Controller vom Typ DC500 (Owis, Staufen) und einen PC. Durch eine in LabView 6.0 (NationalInstruments, München) erstellte Software war es möglich Datenstrukturen vollautomatisch zu schreiben. Durch die langsamen Verstelleinheiten und die geringe Maximalpulsfrequenz ($f = 100 \text{ Hz}$) des Lasers ergeben sich nur langsame Schreibgeschwindigkeiten. Mittlerweile wurde das sequenzielle Schreibsystem durch einen kHz-Pulslaser vom Typ Vector-532-1000-20 ($\lambda = 532 \text{ nm}$, 20 kHz , 6 ns Pulslänge, Coherent, Dieburg) gekoppelt mit einem Galvanoscanner SCANgine14 (Scanlab, Puchheim) ersetzt ^[137, 138]. Mit diesem Setup werden Schreibgeschwindigkeiten von 4000 mm/s erreicht.

5.3.3 Charakterisierung der Photoprodukte

Bereits 1985 stellte Vsevolodov et al. fest, dass energiereiche Laserpulse ($\lambda = 532 \text{ nm}$, Pulslänge 20 ns , $P = 1 \text{ MW/cm}^2$) irreversible Veränderungen in BR-Filmen erzeugen ^[139] (siehe Tab. 22). Bei $\lambda = 694 \text{ nm}$ und $\lambda = 1064 \text{ nm}$ wurden hingegen keine Veränderungen beobachtet. Vsevolodov et al. führten diese Veränderungen auf Mikroeinschlüssen und ungleichmäßige Feuchtigkeitsverteilungen in den Filmen zurück. Eine These, die im Rahmen der in dieser Arbeit enthaltenen Ergebnisse, so nicht haltbar ist. In den folgenden Jahren wurden Arbeiten zur laserinduzierten Veränderung von BR in Suspensionen publiziert (siehe Tab. 22).

Zusammenfassend zeigt sich in den Experimenten, dass in BR-Suspensionen bei Bestrahlung mit intensiven Laserpulsen der Wellenlänge $490 \text{ nm} < \lambda < 610 \text{ nm}$ und Pulslängen $t \geq 30 \text{ ps}$ ein Photoprodukt bei $\lambda \approx 605 \text{ nm}$ und ein weiteres bei $\lambda \approx 360 \text{ nm}$ gebildet wird. Diese Photoprodukte wurden in der Literatur teilweise als P_{605} und P_{360} bezeichnet ^[42, 115, 136]. Das erhaltene Mischprodukt der beiden Photoprodukte findet sich unter dem Namen "laser-induced-blue-membrane" (LIBM) in den Publikationen ^[136]. Die LIBM ist nicht mit der "blue membrane" (BM) identisch obwohl für beide Formen der PM ein ähnliches UV/vis-Spektrum erhalten wird. Die BM wird im Allgemeinen durch Deionisation von PM gebildet ^[140-142]. Um eine Systematik der Bezeichnungen der laserinduzierten Photoprodukte einzuführen wird im

Folgenden das bathochrome Produkt mit F und das hypsochrome entsprechend der Literatur mit P bezeichnet.

Tab. 22: Zusammenfassung der in der Literatur publizierten Untersuchungen zu laserinduzierten Veränderung von BR WT.

Zustand	λ / nm	E / mJ/cm ²	Pulslänge t	Photoprodukte	Lit.
Film	1064	20	20 ns	keine	[139]
Film	694	20	20 ns	keine	[139]
Film	532	20	20 ns	ja / λ nicht bestimmt	[139]
Suspension	532	> 10	10 ns	> 600 nm / 300 - 400 nm	[143]
Suspension	532	> 10	7 ns	605 nm / 360 nm	[42, 113]
Suspension	490-570	15	2 ns	605 nm / 360 nm	[136]
Suspension	532	54	8 ns	605 nm / 360 nm	[136]
Suspension	532	10 - 50	10 ns	605 nm / 360 nm	[144]
Suspension	610	10 - 50	10 ns	605 nm / 360 nm	[144]
Suspension	532	15	30 ps	605 nm / 360 nm	[144]
Suspension	615	12	200 fs	555 nm / (360 nm)	[144]

Bei der Bestrahlung mit ultrakurzen Pulsen von 200 fs Länge und einer Wellenlänge von $\lambda = 615$ nm bildet sich hingegen ein Photoprodukt bei einer Wellenlänge von $\lambda \approx 555$ nm und ein weiteres bei $\lambda \approx 360$ nm. Um die Systematik der Bezeichnungen fortzuführen werden im Folgenden die Bezeichnungen R für das Produkt mit $\lambda \approx 555$ nm und S für das Produkt $\lambda \approx 360$ nm eingeführt. Ein Vergleich der UV/vis-Spektren legt nahe, dass es sich bei P und S um die gleichen Produkte handelt. Da dies nicht abschließend bestätigt werden kann, wird die Unterscheidung beibehalten.

Bisher lagen nur rudimentäre Ergebnisse zum Verhalten von BR-Filmen unter Bestrahlung mit energiereichen Laserpulsen vor. In diesem Kapitel werden die Photoprodukte, die durch Bestrahlung in BR-Filmen bebildet werden, charakterisiert und soweit möglich analysiert. Weiterhin werden die erhaltenen Ergebnisse dann unter Berücksichtigung der Publikationen anderer Forschergruppen zur laserinduzierten Veränderung von BR in Suspensionen diskutiert (siehe Tab. 22) und eine Theorie zur Reaktionsabfolge postuliert.

5.3.3.1 Photoprodukte durch Nanosekunden-Laserpulse

Die Bestrahlung von BR-Suspensionen mit hochenergetischen Laserpulsen ($\lambda = 533$ nm, $t = 3$ ns) führt zu einer irreversiblen Farbverschiebung von lila nach blau. Bei weiterer Laserexposition der Suspension entsteht schließlich ein gelber Farbeindruck.

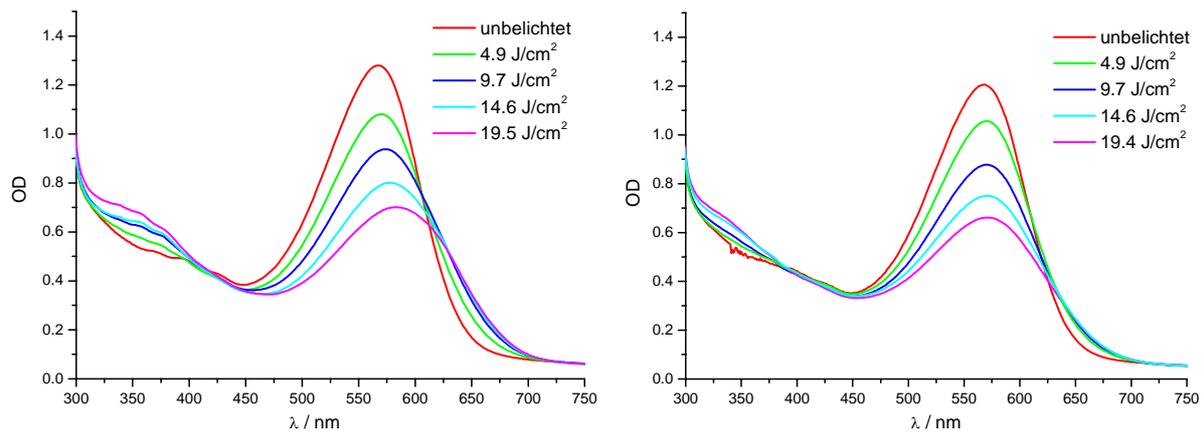


Abb. 62: UV/vis Spektren wässriger BR-Suspensionen vor und nach Laserbestrahlung (Methode N1, $f = 10$ Hz) Links: WT. Rechts: D96N.

Die Laserbestrahlung führt zu einer Abnahme der Absorptionsbande B_{570} und zu einer Zunahme der Absorption im roten Bereich dieser Bande. Für geringe Energien zeigt sich ein isosbestischer Punkt bei $\lambda \approx 610$ nm und ein weiterer bei $\lambda \approx 420$ nm. Weiterhin wird die Bildung von einem oder mehreren Photoprodukten im UV-Bereich mit einem Maximum bei $\lambda = 360$ nm beobachtet (siehe Abb. 62). Es zeigt sich weiterhin, dass die Laserbestrahlung von WT und D96N zu den gleichen Photoprodukten führt und kein unterschiedliches Verhalten zu erkennen ist. Die durchgeführten Experimente decken sich mit den in der Literatur für WT-Suspensionen beschriebenen Ergebnissen ^[113, 136].

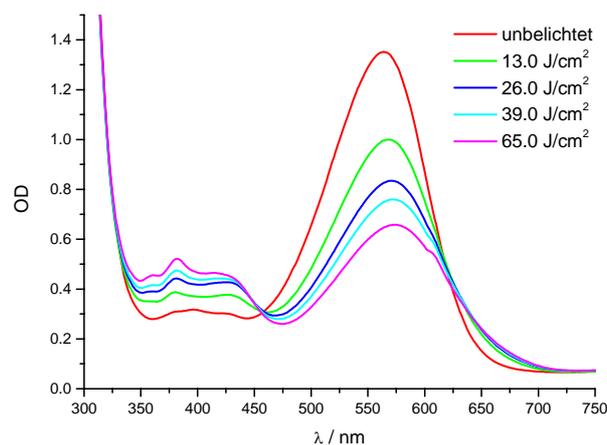


Abb. 63: UV/vis Spektren eines D96N-Films vor und nach Laserbestrahlung (Methode N1, $f = 10$ Hz).

Die an BR-Suspensionen durchgeführten Experimente wurden an BR-Filmen wiederholt (siehe Abb. 63). Es zeigt sich, dass das Absorptionsmaximum des B-Zustands von BR in den verwendeten Filmen leicht hypsochrom nach $\lambda = 562$ nm verschoben ist. Da eine Dunkeladaptation der Filme ausgeschlossen werden kann, ist der Shift auf das Matrixmaterial

Gelatine zurückzuführen. Deutlich ist die Abnahme der Absorptionsbande B_{570} , die Zunahme der Absorption im roten Bereich dieser Bande und die Bildung von einem oder mehreren Photoprodukten im UV-Bereich mit einem Maximum bei $\lambda = 360$ nm zu beobachten. Die isosbestischen Punkte sind bei $\lambda \approx 610$ nm und $\lambda \approx 460$ nm zu erkennen. Vergleichend zeigen Suspension und Filme die gleichen Photoprodukte bei Bestrahlung mit hohen Laserenergien.

Abweichend von den Suspensionen weist PM in Filmen keine Diffusion auf (siehe Kapitel 5.3.2.1). Die Translations- und Rotationsdiffusion der BR-Moleküle innerhalb der Membran wird durch die 2D-kristalline Struktur der PM verhindert. Somit liegt eine zeitlich konstante räumliche Lage der einzelnen BR-Moleküle im Film vor und es ist möglich die laserinduzierte Veränderung der BR-Moleküle räumlich aufgelöst z.B. als Funktion der Polarisierung zu messen.

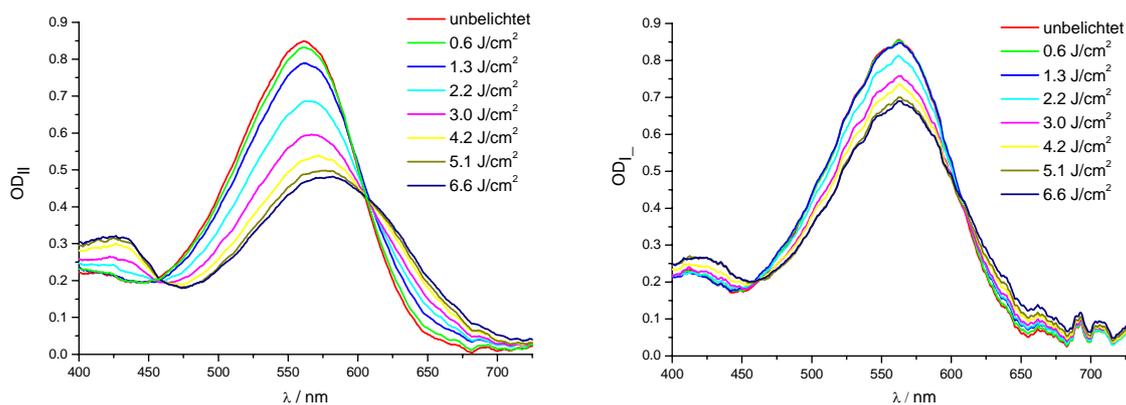


Abb. 64: Polarisationsaufgelöste UV/vis Spektren eines WT-Films vor und nach Laserbestrahlung (Methode N2P, $f = 10$ Hz). Links: gleiche Polarisation. Rechts: orthogonale Polarisation.

Polarisationsaufgelöste UV/vis-Spektren von BR-Filmen nach Laserbelichtung zeigen eine erhöhte Abnahme der OD bei $\lambda = 562$ nm und damit eine verstärkte Bildung der Photoprodukte bezüglich gleicher Polarisation von Schreib- und Messstrahl (siehe Abb. 64). Durch dieses polarisationssensitive Verhalten der Photokonversion wird eine permanente optische Anisotropie im Film induziert (siehe Kapitel 5.3.4). Dieser Prozess kann zur Datenspeicherung in BR-Filmen genutzt werden (siehe Kapitel 5.3.5). In Suspensionen kann dieser Effekt aufgrund der vorhandenen Diffusion der PM-Fragmente nicht beobachtet werden.

Zur Bestimmung der Absorptionsmaxima der Photoprodukte F und P wurden die UV/vis-Spektren aus Abb. 62 zunächst um den Anteil des Streuuntergrunds korrigiert (siehe Kapitel 3.6.1). Im nächsten Schritt wurde die Absorptionsbande vor Laserexposition numerisch gefittet. Ein geeigneter Fit wurde mit einer asymmetrischen Doppelgaussbande erzielt. Die Wellenlänge des Absorptionsmaximums und die erhaltenen Formparameter des Fits wurden für alle weiteren Fits konstant gehalten. Für das bathochrome Produkt F wurden die gleichen Formparameter verwendet. Die OD in freien Einheiten und das Absorptionsmaximum der Zustände B und F ergaben sich aus dem Fit. Für das Photoprodukt P wurden die relevanten Daten aus Differenzspektren erhalten (siehe Tab. 23).

Tab. 23: OD und Absorptionsmaxima der Zustände B, F und P einer WT-Suspension als Funktion der Laserenergie (Methode N1, $f = 10$ Hz) (siehe Abb. 62 links).

E / J/cm²	B-Zustand		F-Zustand		P-Zustand	
	OD / A.U.	λ / nm	OD / A.U.	λ / nm	OD / A.U.	λ / nm
0	1.14	566	0	-	0	-
2.4	0.99	566	0.08	622	0.01	360
4.9	0.87	566	0.16	618	0.03	360
9.8	0.65	566	0.28	617	0.07	360
14.6	0.49	566	0.32	617	0.08	360
19.5	0.38	566	0.34	619	0.13	360
24.3	0.32	566	0.34	618	0.15	360
29.3	0.25	566	0.31	620	0.17	360
39.0	0.20	566	0.24	621	0.21	360
48.8	0.15	566	0.18	623	0.22	360
60.9	0.13	566	0.12	625	0.23	360
73.1	0.09	566	0.08	626	0.24	360

Aus den Fits ergibt sich ein Absorptionsmaximum von $\lambda = 620$ nm für den Zustand F und $\lambda = 360$ nm für den Zustand P. Numerische Fits mit dem in der Literatur oft angegebenen Absorptionsmaximum von $\lambda = 605$ nm für den Zustand F lieferten einen unzureichenden Fit der experimentellen Ergebnisse. Eine genaue Analyse zeigt, dass das in der Literatur angegebene Absorptionsmaximum für F nur durch abschätzende Approximationen bestimmt wurde und das im Rahmen dieser Arbeit durch Zerlegung der Spektren eine genauere Angabe des Absorptionsmaximums möglich wurde.

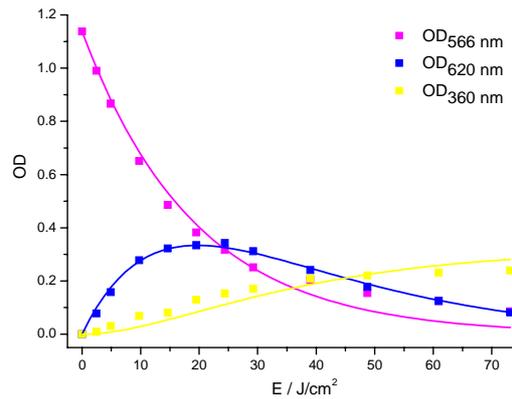


Abb. 65: OD der Zustände B, F und P einer WT-Suspension als Funktion der Laserenergie (Methode N1, $f = 10$ Hz) (siehe Abb. 62 links).

Mit steigender Laserenergie nimmt die Absorption bei $\lambda = 566$ nm ab und die bei $\lambda = 360$ nm zu. Die Absorption bei $\lambda = 620$ nm nimmt zunächst zu und nach Durchlaufen eines Maximums ab. Die Auftragung der OD der Zustände als Funktion der Laserenergie legt somit eine sequenzielle Reaktionsabfolge von B_{570} über F_{620} nach P_{360} nahe (siehe Abb. 65):

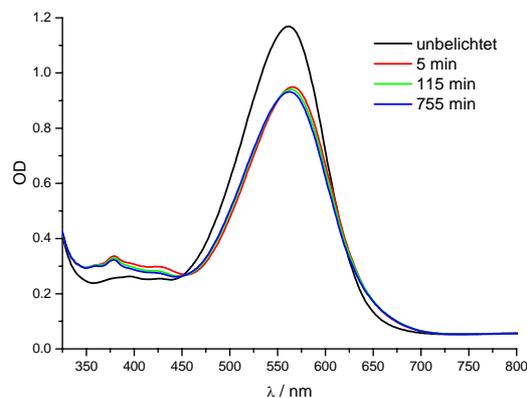


Abb. 66: Thermische OD-Änderung als Funktion der Wellenlänge WT-Film (Methode N1, $f = 10$ Hz).

Die Annahme, dass die Reaktion von F_{620} nach P_{360} ebenfalls photoinduziert ist, wird durch Untersuchung der thermischen OD-Änderung nach Laserbelichtung gestützt. So zeigt ein WT-Film nach Laserbelichtung bis auf Dunkeladaption des nichtkonvertierten B_{570} -Zustands keine Veränderungen des Spektrums in einem Zeitraum von 12 h bei Raumtemperatur (siehe Abb. 66). Insbesondere der bathochrome Teil der Absorptionsbande, also die Absorption des

Zustands F bleibt unverändert. Es kann also ein thermischer Weg ausgeschlossen werden und die Konversion von F_{620} nach P_{360} kann somit nur Photonen induziert erfolgen.

Ausgehend für eine Folgereaktion ergibt sich für den Zerfall von B_{570} folgendes Geschwindigkeitsgesetz ^[111]:

$$\frac{d[B_{570}]}{dt} = -k_a [B_{570}] P^{n_1} \quad (48)$$

mit $[B_{570}]$ Konzentration an B_{570}
 t Zeit
 k_a Konstante für die Reaktion von B_{570} nach F_{620}
 P Laserleistung für die Reaktion von B_{570} nach F_{620}
 n_1 Anzahl der benötigten Photonen für die Reaktion von B_{570} nach F_{620}

Da die Laserleistung während der Photokonversion konstant gehalten wurde, kann nach der Isoliermethode das Geschwindigkeitsgesetz wie folgt zu einem Gesetz pseudo-erster Ordnung vereinfacht werden:

$$\frac{d[B_{570}]}{dt} = -k'_a [B_{570}] \quad (49)$$

mit k'_a Konstante für die Reaktion pseudo-erster Ordnung von B_{570} nach F_{620}

Für die Bildung und den Zerfall von F_{620} gilt:

$$\frac{d[F_{620}]}{dt} = k_a [B_{570}] P^{n_1} - k_b [F_{620}] P^{n_2} \quad (50)$$

mit $[F_{620}]$ Konzentration an F_{620}
 k_b Konstante für die Reaktion von F_{620} nach P_{360}
 P' Laserleistung für die Reaktion von F_{620} nach P_{360}
 n_2 Anzahl der benötigten Photonen für die Reaktion von F_{620} nach P_{360}

Auch hier kann aufgrund der konstanten Laserleistung das Gesetz zu einem pseudo-erster Ordnung vereinfacht werden:

$$\frac{d[F_{620}]}{dt} = k'_a [B_{570}] - k'_b [F_{620}] \quad (51)$$

mit k'_b Konstante für die Reaktion pseudo-erster Ordnung von F_{620} nach P_{360}

Für die Bildung von P_{360} gilt:

$$\frac{d[P_{360}]}{dt} = k_b [F_{620}] P^{n_2} \quad (52)$$

mit $[P_{360}]$ Konzentration an P_{360}

Auch hier wird zu einem Gesetz pseudo-erster Ordnung vereinfacht:

$$\frac{d[P_{360}]}{dt} = k'_b [F_{620}] \quad (53)$$

Wenn zu Beginn der Reaktion gilt, dass nur $[B_{570}]$ vorhanden ist ($[B_{570}] = [B_{570}]_0$), ergibt sich:

$$[B_{570}] = [B_{570}]_0 e^{-k'_a t} \quad (54)$$

mit $[B_{570}]_0$ Konzentration von B_{570} zum Zeitpunkt $t = 0$ s

Es ergibt sich mit $[F_{620}] = 0$ zum Zeitpunkt $t = 0$ s:

$$[F_{620}] = \frac{k'_a}{k'_b - k'_a} (e^{-k'_a t} - e^{-k'_b t}) [B_{570}]_0 \quad (55)$$

Wenn weiterhin $[B_{570}] + [F_{620}] + [P_{360}] = [B_{570}]_0$ gilt, ergibt sich:

$$[P_{360}] = \left(1 + \frac{k'_a e^{-k'_b t} - k'_b e^{-k'_a t}}{k'_b - k'_a} \right) [B_{570}]_0 \quad (56)$$

Die Konzentration von B₅₇₀, F₆₂₀ und P₃₆₀ ergeben sich direkt nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz aus den optischen Dichten bei den jeweiligen Absorptionsmaxima. Somit gilt:

$$OD_{570} = OD_{570/0} e^{-k'_a t} \quad (57)$$

mit OD_{570} Optische Dichte aus Fit bei $\lambda = 570$ nm
 $OD_{570/0}$ Optische Dichte aus Fit bei $\lambda = 570$ nm zum Zeitpunkt $t = 0$ s

$$OD_{620} = \frac{k'_a}{k'_b - k'_a} (e^{-k'_a t} - e^{-k'_b t}) \frac{\varepsilon_{570}}{\varepsilon_{620}} OD_{570/0} \quad (58)$$

mit OD_{620} Optische Dichte aus Fit bei $\lambda = 620$ nm
 ε_{570} Extinktionskoeffizient von B₅₇₀
 ε_{620} Extinktionskoeffizient von F₆₂₀ (unbekannt, im Fit variabel)

$$OD_{360} = \left(1 + \frac{k'_a e^{-k'_b t} - k'_b e^{-k'_a t}}{k'_b - k'_a} \right) \frac{\varepsilon_{570}}{\varepsilon_{360}} OD_{570/0} \quad (59)$$

mit OD_{360} Optische Dichte bei $\lambda = 360$ nm
 ε_{360} Extinktionskoeffizient von P₃₆₀ (unbekannt, im Fit variabel)

Der Fit für die Daten aus Tab. 23 nach den Gleichungen (57)-(59) liefert eine gute Übereinstimmung mit dem experimentellen Ergebnis (siehe Abb. 65) und stützt somit die These einer Folgereaktion vom Typ B₅₇₀ → F₆₂₀ → P₃₆₀.

Für den WT-Film aus Abb. 64 wurde eine äquivalente Analyse der Absorptionsbanden, hier allerdings zusätzlich als Funktion der Polarisierung, durchgeführt. Das Absorptionsmaximum des B₅₇₀-Grundzustands ist mit $\lambda = 561$ nm gegenüber der Suspension um ca. $\Delta\lambda = 5$ nm hypsochrom verschoben. Dies stimmt mit dem für D96N-Filme gefundenen Shift überein (siehe Abb. 63). Auch für den F₆₂₀-Zustand zeigt sich eine hypsochrome Verschiebung von $\lambda = 620$ nm in Suspensionen nach $\lambda = 610$ nm im Film. Verallgemeinernd zeigt sich sowohl in Filmen, als auch in Suspensionen ein spektraler Shift von $\Delta\lambda \approx 50$ nm zwischen F₆₂₀ und B₅₇₀. Somit kann davon ausgegangen werden, dass in BR-Filmen und -Suspensionen die gleiche Photochemie wirkt und Matrixeffekte von geringer Bedeutung sind. Eine Auswertung

bezüglich des P_{360} -Zustands wurde nicht durchgeführt, da das verwendete Spektrometer (Methode 2P) nur eine geringe UV-Empfindlichkeit aufweist.

Tab. 24: OD und Absorptionsmaxima der Zustände B und F einer WT-Film als Funktion der Laserenergie und der Polarisation (Methode N2P, $f = 10$ Hz) (siehe Abb. 64).

E / J/cm ²	II				I			
	B-Zustand		F-Zustand		B-Zustand		F-Zustand	
	OD / A.U.	λ / nm						
0	0.77	561	0	-	0.73	561	0	-
0.27	0.73	561	0.04	572	0.70	561	0.04	568
0.60	0.69	561	0.07	576	0.66	561	0.07	567
0.92	0.67	561	0.07	587	0.65	561	0.08	568
1.28	0.65	561	0.08	598	0.68	561	0.05	576
1.71	0.59	561	0.11	603	0.64	561	0.06	574
2.16	0.52	561	0.14	604	0.64	561	0.06	581
2.70	0.45	561	0.15	606	0.59	561	0.07	581
2.96	0.41	561	0.18	607	0.56	561	0.08	582
3.53	0.35	561	0.20	608	0.55	561	0.08	587
4.23	0.32	561	0.22	609	0.53	561	0.09	589
4.88	0.27	561	0.23	607	0.49	561	0.10	585
5.05	0.26	561	0.24	609	0.48	561	0.10	589
5.87	0.26	561	0.25	611	0.51	561	0.10	596
6.55	0.23	561	0.25	610	0.47	561	0.11	594
7.14	0.23	561	0.26	611	0.46	561	0.11	597

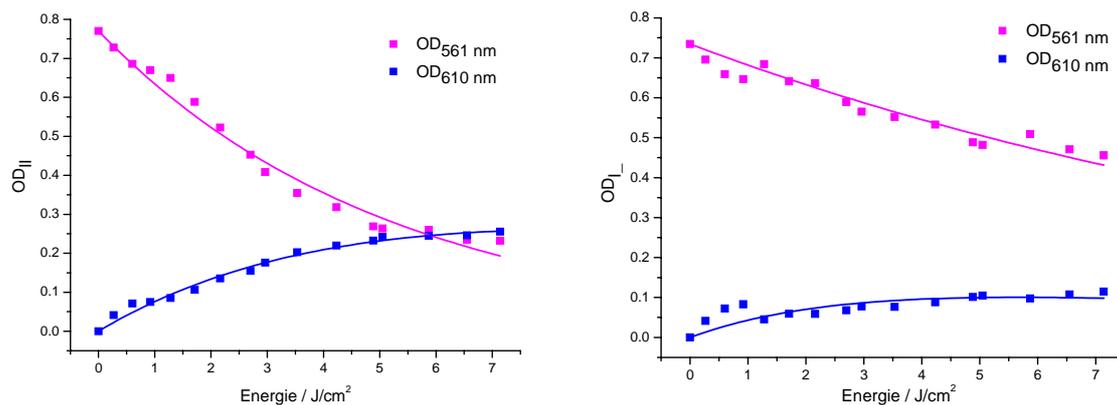


Abb. 67: OD der Zustände B und F eines WT-Film als Funktion der Laserenergie und der Polarisation (Methode N2P, $f = 10$ Hz) (siehe Abb. 64). Links: gleiche Polarisation. Rechts: orthogonale Polarisation.

Der Fit nach den Gleichungen (57)-(59) liefert für BR-Filme ebenfalls eine gute Übereinstimmung mit dem experimentellen Ergebnis (siehe Abb. 67). Zusammenfassend

zeigt sich, dass sowohl für Suspensionen, als auch für Filme die Folgereaktion $B_{570} \rightarrow F_{620} \rightarrow P_{360}$ für die photoinduzierte Konversion von BR angenommen werden kann.

Die Theorie einer sequenziellen Folgereaktion wird auch durch folgendes Experiment gestützt. Im Folgenden wurde die OD als Funktion des Winkels zwischen der Polarisation von Schreib- und Messlicht für den B_{570} -Zustand und für das bathochrome Photoprodukt F_{620} untersucht.

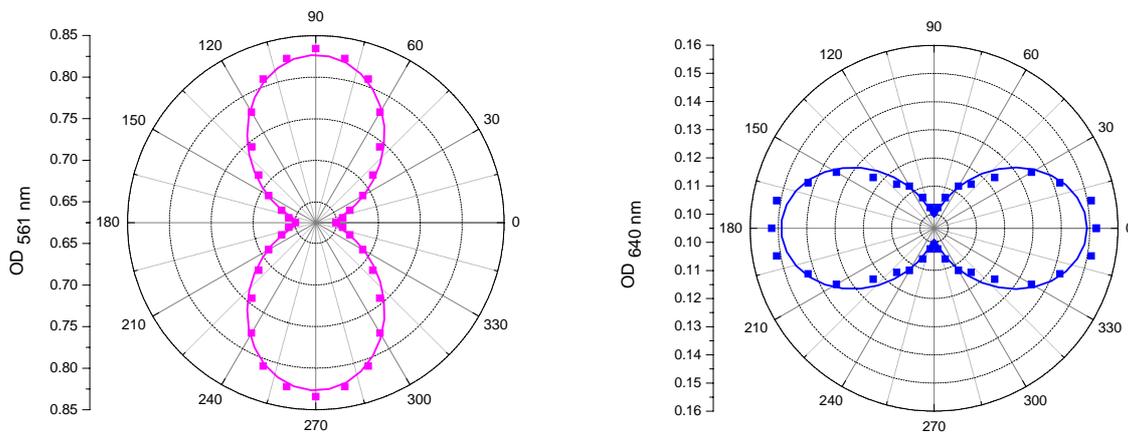


Abb. 68: OD als Funktion des Winkels (deg) zwischen Schreib- und Messstrahl eines WT-Films (Methode N2P, OD = 0.9, $f = 10$ Hz, $E = 10$ J / cm²). Links: $\lambda = 561$ nm. Rechts: $\lambda = 640$ nm.

In UV/vis-Spektren zeigt sich die maximale Anisotropie bezüglich des bathochromen Photoprodukts F_{620} im Maximum des Differenzspektrums bei $\lambda = 640$ nm. Die OD als Funktion des Winkels wurde mit Hilfe des Gesetz von Malus gefittet^[145] (siehe Abb. 68). Die Orientierung der Chromophore im Trimer beträgt 120° zu einander. Somit gilt für die Photokonversionswahrscheinlichkeit der drei BR-Moleküle eines Trimers:

$$PKW \propto I_0^n \cos^2 \theta + I_0^n \cos^2(\theta + 120 \text{ deg}) + I_0^n \cos^2(\theta + 240 \text{ deg}) = \frac{3}{2} I_0^n \quad (60)$$

mit PKW Photokonversionswahrscheinlichkeit
 I Laserintensität
 n Anzahl der benötigten Photonen
 θ Winkel zwischen Schreibstrahl und Chromophor bzw. Messstrahl

Da die Absorptionswahrscheinlichkeit eines Trimers keine Funktion des Winkels darstellt, kann vor der Laserbelichtung von einem völlig isotropen Medium ausgegangen werden. Die photoinduzierte Konversion führt dann zu einer Degeneration des B_{570} -Zustands, hierbei gilt:

$$[B_{570}] \propto 1 - \cos^2 \theta = \cos^2(\theta + 90 \text{ deg}) \quad (61)$$

mit $[B_{570}]$ Konzentration an B_{570}

Unter gleichzeitiger Generation des F_{620} -Zustands, es gilt:

$$[F_{620}] \propto \cos^2 \theta \quad (62)$$

mit $[F_{620}]$ Konzentration an F_{620}

Nach diesem Modell ergibt sich für F_{620} eine um 90° gedrehte Verteilung bezogen auf die Verteilung von B_{570} . Nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz ergibt sich dann:

$$OD_{570} = C_1(1 - \cos^2 \theta) + C_2 \quad (63)$$

mit C_1 Maximales ΔOD zum isotropischen Anteil (Fit $C_1 = 0.18$)
 C_2 OD des isotropischen Anteil (Fit $C_2 = 0.65$)

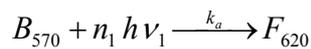
$$OD_{620} = C_3 \cos^2 \theta + C_4 \quad (64)$$

mit C_3 Maximales ΔOD zum isotropischen Anteil (Fit $C_3 = 0.05$)
 C_4 OD des isotropischen Anteil (Fit $C_4 = 0.10$)

Der Fit nach Gleichung (63) & (64) zeigt eine gute Übereinstimmung mit den experimentellen Werten (siehe Abb. 68). Das Gesetz von Malus wird somit für die photoinduzierte Konversion von BR-Filmen erfüllt. Die OD bei $\lambda = 570$ nm zeigt bei der gleichen Polarisation von Schreib- und Messlicht (0°) die maximale Abnahme. Für die OD bei $\lambda = 640$ nm zeigt sich hingegen bei der orthogonalen Polarisation von Schreib- und Messlicht (90°) die maximale Abnahme. Dieses Verhalten ist ein starker Hinweis für eine direkte

Photokonversion des Photoprodukts F_{620} aus dem Zustands B_{570} und stützt somit die These von der Folgereaktion $B_{570} \rightarrow F_{620} \rightarrow P_{360}$.

Die Natur der Photokonversion von B_{570} nach F_{620} stellt eine weitere interessante Fragestellung dar. Hierzu gilt folgende Reaktionsgleichung:



Für geringe Laserintensitäten dominiert die Einphotonenreaktion von B_{570} nach J_{625} mit Isomerisierung des Retinals und anschließendem Photozyklus (siehe 2.4). Es ist somit unwahrscheinlich, dass die Photokonversion zu F_{620} eine Einphotonenreaktion ist, wahrscheinlicher ist eine Zweiphotonenabsorption durch das B_{570} . Für eine Zweiphotonenreaktion ergeben sich mehrere mögliche Reaktionsabläufe^[146]:

1. Eine reine Zweiphotonenabsorption über ein virtuelles Zwischenniveau. Eine Einstrahlung bei $\lambda = 532$ nm würde bei einer reinen Zweiphotonenabsorption die Tryptophane des Proteinsgerüsts mit einem Absorptionsmaximum bei $\lambda = 280$ nm anregen.
2. Eine resonante Zweiphotonenabsorption über ein reales Zwischenniveau.
3. Ein sequenzieller biphotonischer Prozess über ein frühes Photointermediat im Photozyklus. Da die Experimente mit einer Pulslänge $t = 3$ ns durchgeführt wurden, kommen prinzipiell alle Intermediate von B_{570} bis K_{590} in Frage.

Wobei der Übergang zwischen dem 2. und 3. Reaktionsablauf als fließend betrachtet werden muss. Die Kinetik der Photokonversion kann durch die Methode der Anfangsgeschwindigkeiten analysiert werden^[144]. Ausgehend von der Gleichung (48), in der angenommen wird, dass die Reaktion 1. Ordnung in der OD_{570} und n-ter Ordnung in der Laserleistung ist, ergibt sich nach Lambert-Beerschen-Gesetz:

$$\frac{\Delta OD_{570}}{\Delta t_{Puls} f \Delta t} = -k_a OD_{570} P^{n_1} \quad (65)$$

mit ΔOD_{570} Änderung der OD bei $\lambda = 570$ nm
 Δt_{Puls} Pulslänge (hier $\Delta t_{Puls} = 3$ ns)
 f Frequenz des Lasers (hier $f = 20$ Hz)
 Δt Belichtungsintervall

Davon ausgehend, dass für die ersten 20% der Photokonversion $OD_{570} = OD_{570/0}$ gilt und die Konzentration des Photoprodukts F_{620} klein gegenüber der von B_{570} ist, ergibt sich mit

$$E_{total} = \Delta t_{Puls} f \Delta t:$$

$$\frac{\Delta OD_{570}}{\Delta t_{Puls} f \Delta t P OD_{570}} = \frac{\Delta OD_{570}}{E_{total} OD_{570}} = \frac{\Delta OD_{570}}{E_{total} OD_{570/0}} = -k_a P^{n_1-1} \quad (66)$$

mit E_{total} Gesamtenergie des Pulszugs

Die lineare Regression im doppeltlogarithmischen Plot liefert eine Reaktionsordnung von $n = 1.60$ für die Konversion in BR-Filmen (siehe Abb. 69). Dieses Ergebnis stützt die zuvor aufgestellte These von einem Zweiphotonenprozess und deckt sich mit den Ergebnissen für die Photokonversion von BR in Suspensionen für die Reaktionsordnungen von $n = 1.5 - 1.8$ gefunden wurden [113, 136, 144].

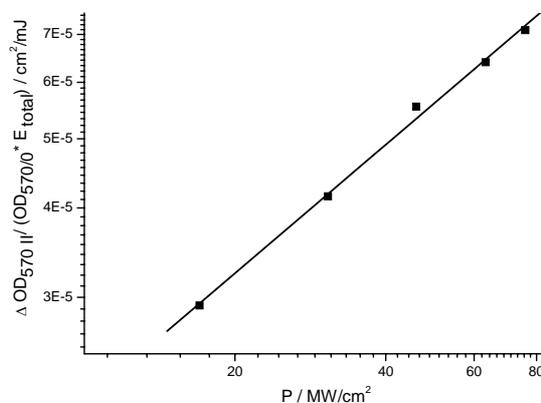


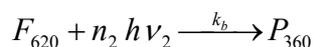
Abb. 69: Leistungsabhängigkeit der Photokonversion von B_{570} nach F_{620} für einen WT-Film (Methode N6P, $OD = 1.0$, $f = 20$ Hz).

Weiterhin ist es nahe liegend, dass der Prozess über eine resonante Zweiphotonenreaktion bzw. über einen sequenziellen biphotonischen Prozess abläuft, da für den Photokonversionsprozess mit $\delta_{532} = 1.0 \cdot 10^6$ GM sehr hohe Goeppert-Mayer-Werte ^[146] gemessen wurden ^[136]. Für einen reinen Zweiphotonenprozess über ein virtuelles Niveau wären Goeppert-Mayer-Werte von $\delta \leq 10$ GM zu erwarten. Für die Zweiphotonenabsorption der 8 Tryptophane (W) pro BR-Molekül wurde ein $\delta_{532}^W = 80$ GM abgeschätzt ^[136]. In einem sequenziellen biphotonischen Prozess bzw. einer resonanten Zweiphotonenreaktion würde das erste Photon durch den Grundzustand B₅₇₀ absorbiert werden. Als mögliches Intermediat bzw. Zwischenzustand zur Absorption des zweiten Photons würden dann die Zustände in Frage kommen, die innerhalb des Laserpulses mit $t = 3$ ns gebildet werden. Gemäß der Tab. 25 wären dies B_{fast}, I₄₆₀, J₆₂₅ oder K₅₉₀ ^[147-149].

Tab. 25: Bildungs- und Zerfallshalbwertszeiten der frühen Intermediate im Photozyklus.

Zwischenzustand/ Intermediat	Bildungshalbwertszeit	Zerfallshalbwertszeit
B _{fast}	≤ 50 fs	≥ 100 fs - 200 fs
I ₄₆₀	≥ 100 fs - 200 fs	≈ 500 fs
J ₆₂₅	≈ 500 fs	≈ 3 ps
K ₅₉₀	≈ 3 ps	≈ 2 μ s

Für die Folgereaktion von F₆₂₀ nach P₃₆₀ kann wie zuvor diskutiert eine thermische Induktion ausgeschlossen werden.



Da die Proben auch nach längerer Bestrahlung mit breitbandigen Lichtquellen keine Veränderung des UV/vis-Spektrums bzw. des Farbeindrucks zeigen, kann postuliert werden, dass die Photokonversion ebenfalls ein Zweiphotonenprozess ist. Auf eine Analyse der Leistungsabhängigkeit dieser Reaktion wurde verzichtet.

Zusammenfassend ergibt sich sowohl für Suspensionen, als auch für Filme für die untersuchten BB-Typen WT und D96N folgendes Modell für die Photokonversion durch ns-Laserpulse (siehe Abb. 70) ^[128].

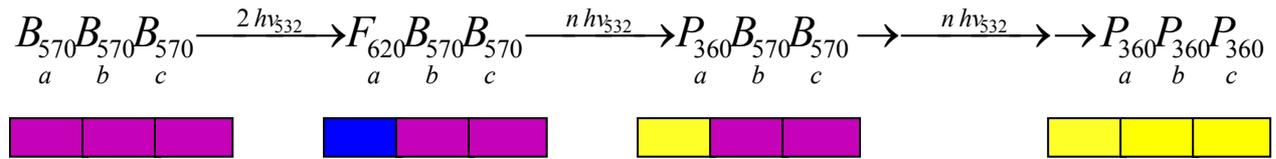


Abb. 70: Modell zur photoinduzierten Veränderung von BR durch ns-Laserpulse nach Fischer et al ^[128].

Durch Absorption von zwei Photonen erfolgt die Umwandlung von B_{570} in F_{620} , wobei die Photokonversion innerhalb des absorbierenden BR-Moleküls stattfindet. In einem weiteren photoinduzierten Prozess wird das gebildet F_{620} in das Produkt P_{360} umgewandelt. Durch weitere Belichtungsschritte können schließlich auch die übrigen Monomere innerhalb des Trimers umgewandelt werden. Das im Rahmen dieser Arbeit postulierte Modell steht konträr zum bisher in der Literatur beschriebenen Modell. Das bisherige Modell zur Bildung von LIBM beruht auf Masthay et al. ^[136] (siehe Abb. 71).

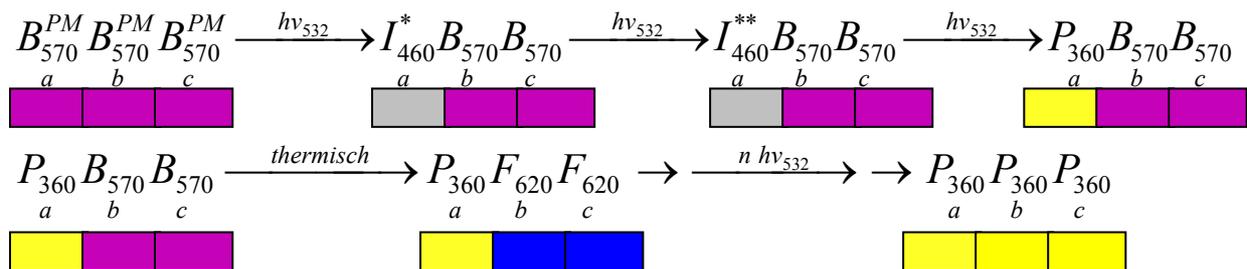


Abb. 71: Modell zur photoinduzierten Veränderung von BR durch ns-Laserpulse nach Masthay et al ^[136].

Durch Anregung des Grundzustands B_{570} im BR-Trimer mittels eines intensiven Laserpulses wird in einem resonanten Zweiphotonenprozess über den Zwischenzustand I_{460} das Photoprodukt P_{360} gebildet. I_{460} ist der Post-Franck-Condon-Zustand im Photozyklus von BR (siehe Kapitel 2.4) ^[147, 150]. Es wird angenommen, dass das Retinal im I_{460} in einer $\sim 90^\circ$ Konfiguration im Vergleich zu all-*trans* $=: 0^\circ$ und der 13-*cis* $=: 180^\circ$ vorliegt. Die Bildung von P_{360} führt durch veränderte Wechselwirkungen der BR-Monomere im Trimer (siehe Kapitel 2.2) zu einer Konfigurationsänderung der nicht photochemisch veränderten BR-Monomere. Diese Änderung von B_{570} zum F_{620} äußert sich in einem bathochromen Shift des Absorptionsmaximums. Durch mehrmaliges Durchlaufen des photochemischen Prozesses

kann auch F_{620} in P_{360} umgewandelt werden und das Endprodukt ist ein Trimer der aus drei P_{360} -Einheiten besteht.

Das auf Masthay et al. beruhende Modell zur Photokonversion kann allerdings nicht die experimentellen Ergebnisse erklären, die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen wurden. Ausgehend von Abb. 71 geht die Bildung von F_{620} mit der Bildung von P_{360} einher, somit wäre für beide Photoprodukte eine identische Kinetik und ein reziprokes Verhalten zur B_{570} -Konzentration bei Laserbelichtung zu erwarten. Dies deckt sich nicht mit der gefunden sequenziellen Bildung von F_{620} und P_{360} . So zeigt sich im Experiment für das Intermediat F_{630} zunächst eine Zunahme und dann eine Abnahme der Konzentration (siehe Abb. 65). Weiterhin reagiert im Modell nach Masthay et al. B_{570} durch Absorption von zwei Photonen zu P_{360} . Durch Konformationsänderungen ändern die zwei intakten BR Moleküle im Trimer ihr Absorptionsmaximum und es ergibt sich das Produkt P_{605} .

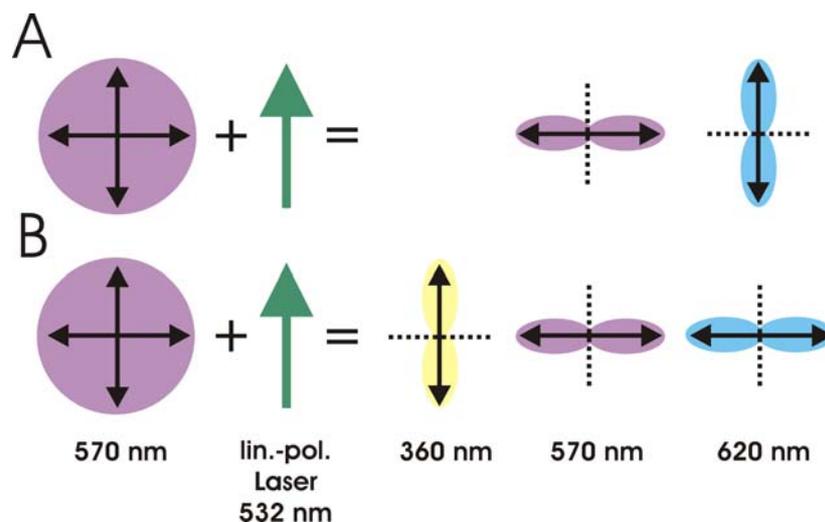


Abb. 72: Schematische Darstellung zur polarisationsaufgelösten Photokonversion in BR-Filmen. A: Experimenteller Befund bzw. Modell nach Fischer et al. B: Modell nach Masthay et al.

Nach diesem Modell ergibt sich für polarisationsaufgelöste Experimente im Film eine parallele Orientierung der Absorption bei $\lambda = 570$ nm und $\lambda = 620$ nm (siehe Abb. 72). Das Experiment zeigt hingegen eine orthogonale Orientierung der beiden Photoprodukte (siehe Abb. 68). Nur ein Modell der direkten Photokonversion von B_{570} nach F_{620} , wie es in Abb. 70 dargestellt ist, kann diesen Sachverhalt erklären. Die Interaktion der BR-Monomere im Trimer wird in dem von Fischer et al. aufgestellten Modell nicht gänzlich ausgeschlossen,

sollte aber nach den experimentellen Ergebnissen für die Photokonversion von geringer Bedeutung sein.

Abschließend wird deutlich, dass das nach Fischer et al. prognostizierte Modell die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen experimentellen Daten mit einschließt und somit bis auf weiters als gültig angesehen werden kann.

5.3.3.1.1 Die Natur der Photoprodukte F_{620} und P_{360}

Im folgenden Abschnitt soll die Natur der Photoprodukte F_{620} und P_{360} näher charakterisiert werden. Um globale Änderungen in der Struktur der PM-Fragmente zu untersuchen, wurden D96N-Filme vor und nach der Laserbelichtung mittels Kleinwinkelstreuung betrachtet. In Abb. 73 zeigt sich keine Veränderung des Streumusters durch die Photokonversion. Es können somit globale Veränderungen in der 2D-Kristallstruktur der Purpurmembran ausgeschlossen werden (siehe Kapitel 2.2). Dies stellt eine wichtige Erkenntnis für die Langzeitintegrität der in BR gespeicherten Daten dar, da die Diffusion der BR-Moleküle innerhalb der Membran durch die Kristallstruktur verhindert wird. Ein Verlust der Kristallstruktur würde somit mit einer verringerten Stabilität der Daten einhergehen (siehe Kapitel 5.3).

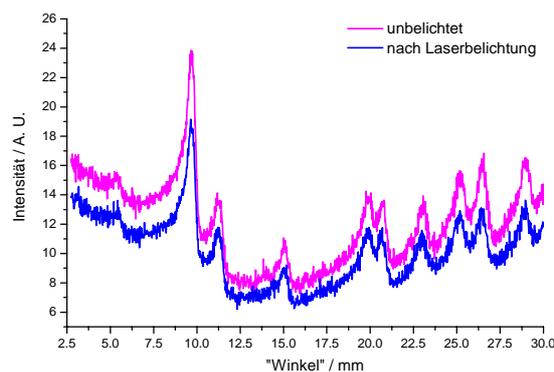


Abb. 73: Untersuchung von D96N-Filmen mittels Kleinwinkelstreuung (Methode N) (siehe Kapitel 3.8.1).

Die bestehende Literatur zusammenfassend, wird angenommen, dass das Photoprodukt P_{360} durch Photoreduktion der Schiffschens Base in BR gebildet wird. Das Endprodukt der Reduktion ist ein Retinal das über eine C-N Einfachbindung an das Lysin-216 gebunden ist

[113, 136]. Die Identifizierung des P_{360} erfolgte anhand von UV/vis- und Fluoreszenzspektroskopie im Bezug zur Literatur, in der zuvor durch andere Wege reduzierte Retinalspezies dargestellt worden waren. So wird die Bildung von Retroretinyle bei der Reduktion von BR mit NaBH_4 durch Belichtung [151], durch Beschuss von BR mit Elektronenstrahlung [152] und durch Belichtung mit UV-Licht [120, 153] beschrieben. Vergleicht man die zuvor in der Literatur angegebenen Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften mit denen des P_{360} , liegt der Schluss nahe, dass es sich bei dem P_{360} um eine reduzierte Schiffische Base handelt. Gemäß Abb. 74 wurden in der Literatur für P_{360} die *retro*- und *non-retro* reduzierte Schiffische Base diskutiert und die *non-retro*-Form für wahrscheinlicher eingestuft [136].

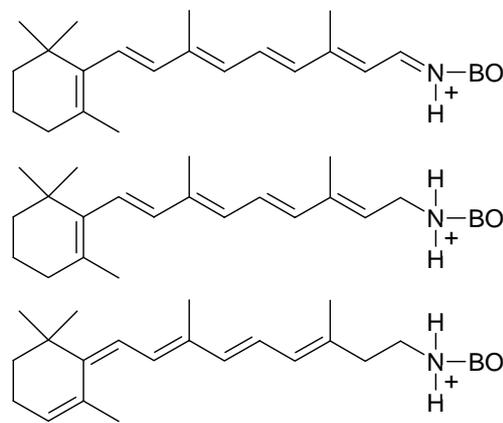


Abb. 74: Unterschiedliche Formen der Retinal-Lysin-Bindung. Oben: *all-trans*-retinyl-protonierte Schiffische Base (B_{570} -Zustand). Mitte: *non-retro*-reduzierte Schiffische Base. Unten: *retro*-reduzierte Schiffische Base.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden massenspektrometrische Experimente durchgeführt, die die Aussage stützen, dass im Produkt P_{360} eine reduzierte Schiffische Base vorliegt. In der Probenvorbereitung (siehe Kapitel 3.6.4.1) erfolgt im Fall einer C-N-Doppelbindung zwischen Retinal und Lysin, wie sie normalerweise in BR vorliegt, eine hydrolytische Spaltung der selbigen und in der Massenspektrometrie wird das Bakterioropsin (BO) mit einer Masse von 26782.6 Da (D96N) bzw. 26783.6 Da (WT) beobachtet. Für eine C-N-Einfachbindung, wie sie für den Fall der reduzierten Schiffische Base vorliegt, kann keine hydrolytische Spaltung erfolgen und es ist die Masse von 27051.0 Da (D96N) bzw. 27052.0 Da (WT) zu erwarten.

Im Vergleich von Abb. 75 (rechts) mit Abb. 109 (siehe Kapitel 6.3.2) ist deutlich der zusätzliche Massenpeak mit einem Maximum bei 27004.3 Da zu erkennen. Weiterhin zeigen die Spektren nach Photokonversion eine starke Peakverbreiterung, die weitestgehend neben Ionenaddukten auf die Bildung von nicht näher spezifizierbaren Nebenprodukten der Photoreaktion zurückzuführen ist. Das Maximum des BO-Peaks liegt hier mit 26732.8 Da um 50.8 Da unter der erwarteten Masse. Unter der Annahme, dass die Verteilung der Nebenprodukte für beide Peaks gleich ist, ergibt sich für das Maximum des zusätzlichen Massenpeaks ebenfalls eine Verschiebung von 50.8 Da. Die Produktmasse würde dann mit 27055.1 Da der des BR mit reduzierter Schiffsche Base entsprechen.

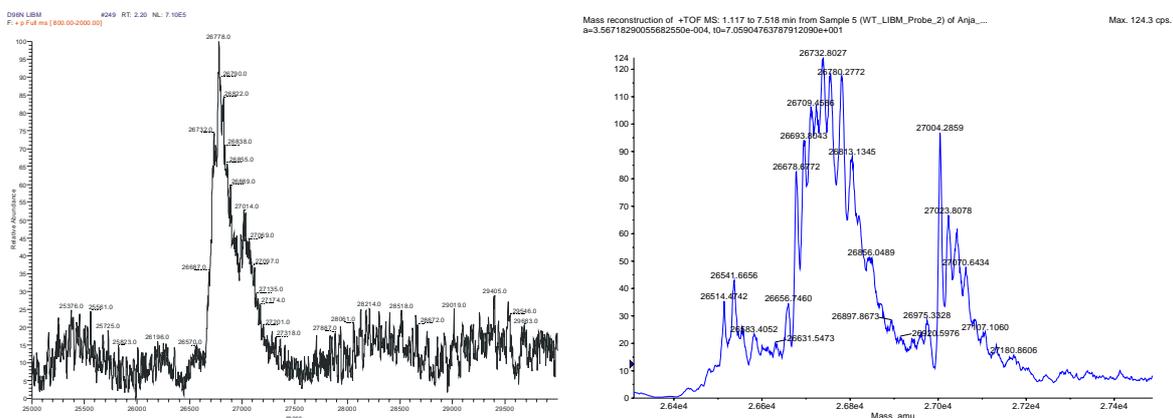


Abb. 75: MS-Messung von BR nach Laserbelichtung. Links: Messung von D96N mit MS vom Typ LCQDuo (Thermo, Dreieich). Rechts: Messung von WT mit MS vom Typ QStar Pulsar (Applied Biosystems, Darmstadt) ^[154].

Aus vorläufigen Forschungsergebnissen zogen Masthay et al. ^[136] den Schluss, dass das Photoprodukt P₆₀₅ durch Konformationsänderungen im BR gebildet wird. Nach ihrer Theorie führt die Bildung von P₃₆₀ durch veränderte Wechselwirkungen der BR-Monomere im Trimer (siehe Kapitel 2.2) zu einer Konfigurationsänderung der nicht photochemisch veränderten BR-Monomere, die sich in einem bathochromen Shift des Absorptionsmaximums nach $\lambda = 620$ nm äußert (siehe Abb. 71). Wie durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente gezeigt wurde (siehe Abb. 70), erfolgt die Bildung von F₆₂₀ direkt aus B₅₇₀ und somit kann für die Photokonversion die Interaktion der BR-Monomere im Trimer nur von geringer Bedeutung sein. Eine Charakterisierung von F₆₂₀ auf molekularer Ebene gestaltet sich äußerst schwierig, da dieses Produkt analytisch schwer zugänglich ist, so geht z.B. die Natur des Photoprodukts nach momentanem Erkenntnisstand bei der Monomerisierung verloren ^[136]. Die Monomerisierung wird als ein essentieller Schritt zur Isolation des Produkts aus der PM für Charakterisierung angesehen. Auch eine Aufklärung der Natur von F₆₂₀ in membranintegrierter Form, also in situ, wurde bisher nicht erreicht.

5.3.3.2 Photoprodukte durch Femtosekunden-Laserpulse

Wie bereits zuvor in Tab. 22 zusammengefasst, bildet sich bei Bestrahlung mit ultrakurzen Pulsen von 200 fs Länge und einer Wellenlänge von $\lambda = 615$ nm in WT-Suspensionen ein Photoprodukt bei $\lambda \approx 555$ nm und ein weiteres bei $\lambda \approx 360$ nm (siehe Abb. 76). Es wurden die Bezeichnungen R für das Produkt mit $\lambda \approx 555$ nm und S für $\lambda \approx 360$ nm eingeführt.

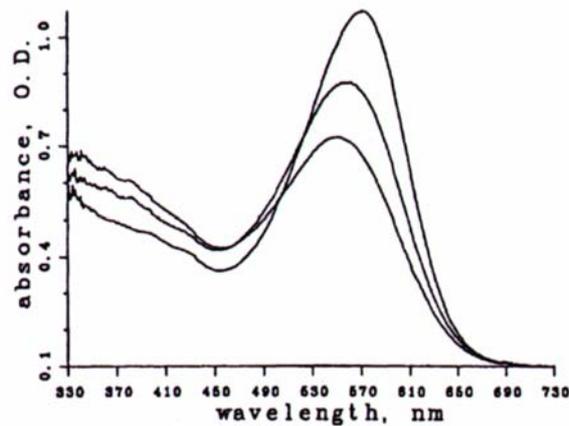


Abb. 76: UV/vis Spektren einer WT-Suspension vor und nach Laserbestrahlung ($\lambda = 615$ nm, $t = 200$ fs, Kurven mit abnehmender OD: unbelichtet, 21.6 J/cm², 108.0 J/cm²). Abb.aus ^[144].

Zur Bestrahlung von BR-Filmen mit fs-Laserpulsen lagen bisher keine Ergebnisse vor. Im Folgenden wurden Experimente diesbezüglich an D96N-Filmen durchgeführt.

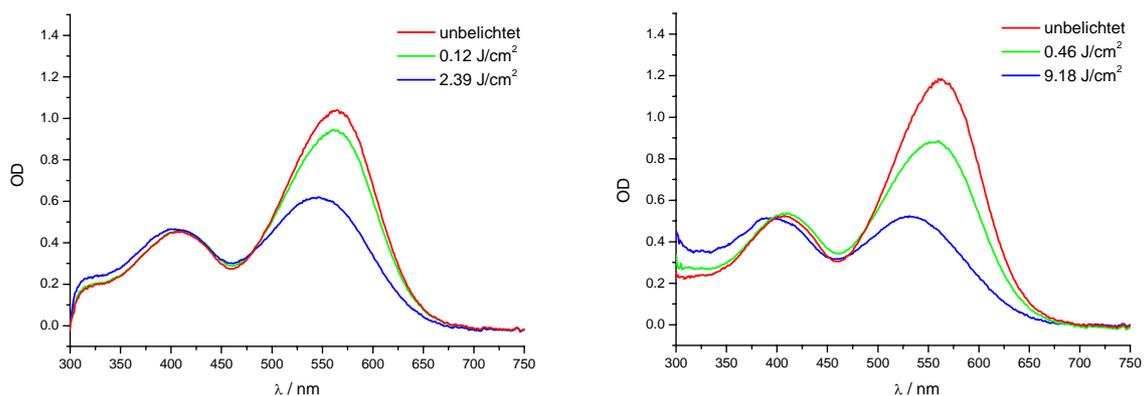


Abb. 77: UV/vis Spektren eines D96N-Films (OD 1.5) vor und nach Laserbestrahlung (Methode F4) Links: $\lambda = 530$ nm, $t = 175$ fs. Rechts: $\lambda = 530$ nm, $t = 52$ fs.

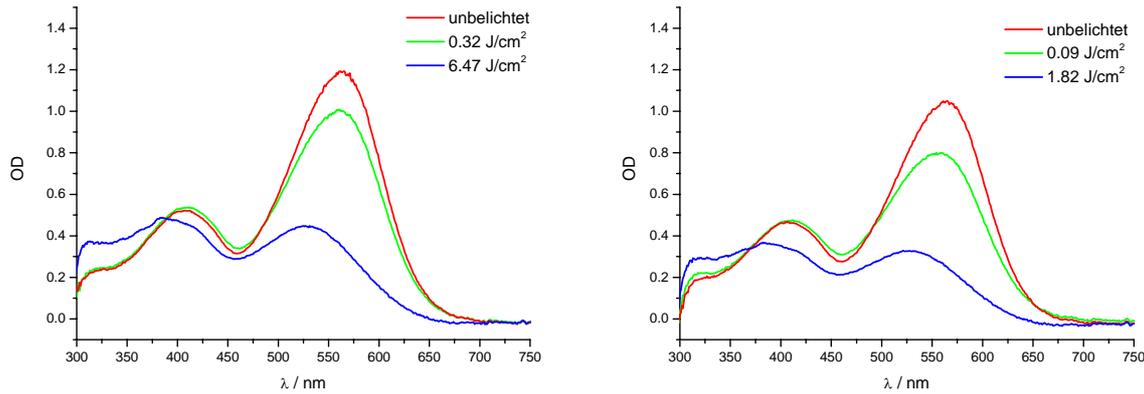


Abb. 78: UV/vis Spektren eines D96N-Films (OD 1.5) vor und nach Laserbestrahlung (Methode F4) Links: $\lambda = 570$ nm, $t = 46$ fs. Rechts: $\lambda = 630$ nm, $t = 33$ fs.

Für die Filme muss auch hier die leicht hypsochrome Verschiebung des B-Zustand nach $\lambda = 562$ nm beim Vergleich mit den Suspensionen berücksichtigt werden. Es zeigt sich in Abb. 76 bis Abb. 78 eine deutliche Abnahme der Absorptionsbande B_{570} mit einem starken hypsochromen Shift der Bande und eine Zunahme der Absorption im UV-Bereich bei $\lambda < 375$ nm. In Filmen zeigt sich weiterhin eine starke Absorption mit einem Maximum bei $\lambda = 410$ nm, die auf das Intermediat M_{410} beruht und durch Initiation des Photozyklus durch das Messlicht hervorgerufen wird. Es handelt sich somit um ein im Bezug auf das verwendete Spektrometer nicht vermeidbares Messartefakt. Zur Bestimmung des Absorptionsmaximums des Photoprodukts R wurden die UV/vis-Spektren aus Abb. 77 & Abb. 78 zunächst um den Anteil des Streuuntergrunds korrigiert (siehe Kapitel 3.6.1). Im nächsten Schritt wurde die Absorptionsbande vor Laserexposition numerisch gefittet. Ein geeigneter Fit wurde mit einer asymmetrischen Doppelgaussbande erzielt. Für das Photoprodukt R wurde in Filmen das Maximum bei $\lambda = 535$ nm bestimmt. Für Suspensionen ist aus der Literatur nur das Maximum der Mischbande aus R_{535} und B_{570} mit $\lambda = 555$ nm bekannt. Eine exakte Bestimmung des Maximums für das Photoprodukt S war nur begrenzt möglich, da sich hier die Bande mit der Absorption von M_{410} überlagert und das Photoprodukt S_{360} nach Abb. 76 kein scharfes Maximum zeigt. Die Ergebnisse sind zusammenfassend in Tab. 22 dargestellt.

Vergleichend zeigen Suspensionen und Filme für die Mutanten WT und D96N die gleichen Photoprodukte bei Bestrahlung mit fs-Laserpulsen. In Filmen zeigt sich gegenüber Suspensionen ein polarisationssensitives Verhalten bei Photokonversion mittels fs-Laserpulsen und es wird eine permanente optische Anisotropie im Film induziert (siehe Kapitel 5.3.4). In

Suspensionen wurde der Effekt für fs-Pulse aufgrund der vorhandenen Diffusion der PM-Fragmente nicht beobachtet. Die Natur der Photoprodukte R_{535} und S_{360} ist bisher unbekannt.

Tab. 26: Zusammenfassung der Untersuchungen zur laserinduzierten Veränderung von BR mit fs-Laserpulsen (* Maximum der Mischbande aus R_{535} und B_{570} / kein Doppelgaussfit verfügbar).

Zustand	Mutante	λ / nm	Pulslänge t	Photoprodukte	Lit.
Suspension	WT	615	200 fs	555 nm* / (360 nm)	[144]
Film	D96N	530	175 fs	535 nm / (360 nm)	Abb. 77
Film	D96N	530	52 fs	535 nm / (360 nm)	Abb. 77
Film	D96N	570	46 fs	535 nm / (360 nm)	Abb. 78
Film	D96N	630	33 fs	535 nm / (360 nm)	Abb. 78

5.3.4 Charakterisierung und Optimierung der optischen Anisotropie

Wie bereits im Kapitel 5.3.3 dargestellt, führt die Belichtung von BR-Filmen mit ns- und fs-Laserpulsen zu einer optischen Anisotropie im Film. Neben der durch die Laserbestrahlung induzierten Farbänderung, die auf die Bildung der jeweiligen Photoprodukte F_{620} und P_{360} bzw. R_{535} und S_{360} beruht, kann auch die induzierte Anisotropie im Film zur Datenspeicherung genutzt werden (siehe Kapitel 5.3.5). Im Folgenden wurde die in BR-Filmen induzierbare optische Anisotropie charakterisiert und hinsichtlich der Entwicklung eines BR-basierten WORM-Speichers optimiert.

5.3.4.1 Optische Anisotropie durch ns-Laserpulse

Die optische Anisotropie wurde, falls nicht anders angegeben, gemäß Gleichung (46) im Absorptionsmaximum des B_{570} -Zustands, der in Filmen bei $\lambda = 561$ nm liegt, bestimmt. Die hier durchgeführten Messungen sind auf einen breiten Wellenlängenbereich ($475 \text{ nm} < \lambda < 600 \text{ nm}$) übertragbar, innerhalb dieses Bereichs stellt die Anisotropie bzw. der Dichroismusfaktor (siehe Gleichung (47)) keine Funktion der Wellenlänge dar (siehe Abb. 79).

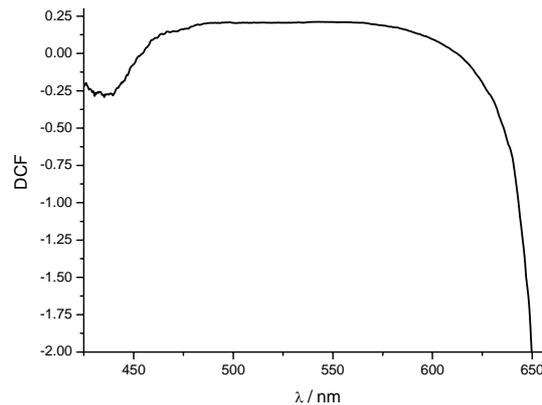


Abb. 79: Dichroismusfaktor DCF als Funktion der Wellenlänge λ für einen WT-Films (Methode N2P, OD 0.9, $f = 10$ Hz, $E = 10$ J / cm²).

Bei den Untersuchungen zur relativen OD-Änderung als Funktion der Gesamtenergie der Laserpulse zeigte sich, dass die Photokonvertierung für gleiche Polarisation von Schreib- und Messstrahl (OD_{\parallel}) effizienter als für orthogonale Polarisation (OD_{\perp}) abläuft (siehe Abb. 80-Abb. 83).

Im Verlauf der Messungen zeigte sich ein sigmodaler Fit nach Gleichung (67) als geeignet zur mathematischen Beschreibung der Messdaten:

$$\frac{\Delta OD}{OD_0} = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{E-E_0}{dE}}} + A_2 \quad (67)$$

mit A_1, A_2, E_0 & dE Variablen des Fits

Vergleichend zeigt sich, dass in den Fits für OD_{\parallel} und OD_{\perp} die relative OD-Änderung bei fortschreitender Laserbelichtung unterschiedlichen Maxima entgegen strebt. Aus den Fits wurde der Dichroismusfaktor (DCF) als Funktion der Laserenergie berechnet. Der DCF, also die relative optische Anisotropie, zeigt für die Experimente mit Pulszügen von 10 Pulsen ein deutliches Maximum. Dieses Maximum ist die maximal induzierbare Anisotropie im Film und stellt für die anisotrope Datenspeicherung das Schreiboptimum dar. Für die Experimente, die mit einem Puls bei steigender Energie durchgeführt wurden, zeigt sich, dass bei den vom Laser verfügbaren Energien das DCF-Maximum nicht erreicht wurde. Zum Erreichen des Anisotropieoptimums in der optischen Datenspeicherung sind somit mehrere Pulse zu

verwenden oder der Laserstrahl ist zu kollimieren. Die Wiederholrate der Pulse wurde mit $f = 10$ Hz so niedrig gewählt, dass davon auszugehen ist, dass von Puls zu Puls die in den Photozyklus angeregten BR-Moleküle wieder im Grundzustand B_{570} vorliegen und somit eine maximale Quantenausbeute für die Photokonversion nach F_{620} bzw. P_{360} gewährleistet wird (siehe Kapitel 2.4).

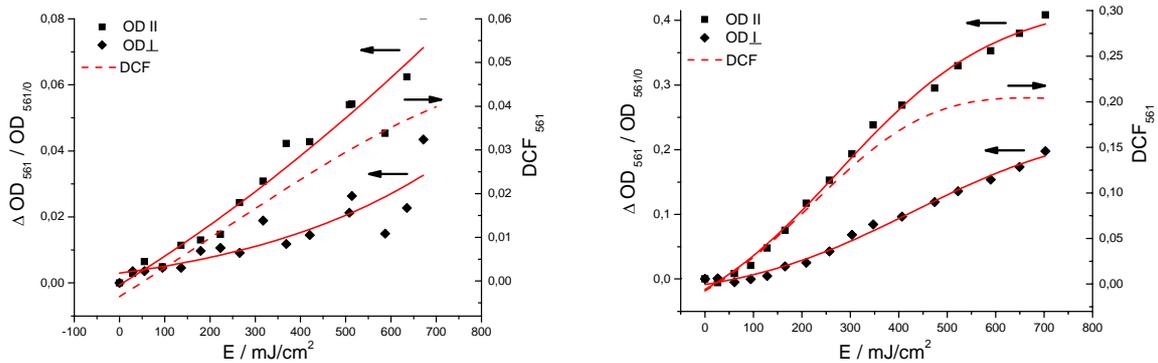


Abb. 80: Relative OD-Änderung und DCF als Funktion der Gesamtenergie der Laserpulse (Methode N2P, WT, OD 1.5, $f = 10$ Hz). Links: 1 Pulsexperiment. Rechts: 10 Pulse im Pulszug.

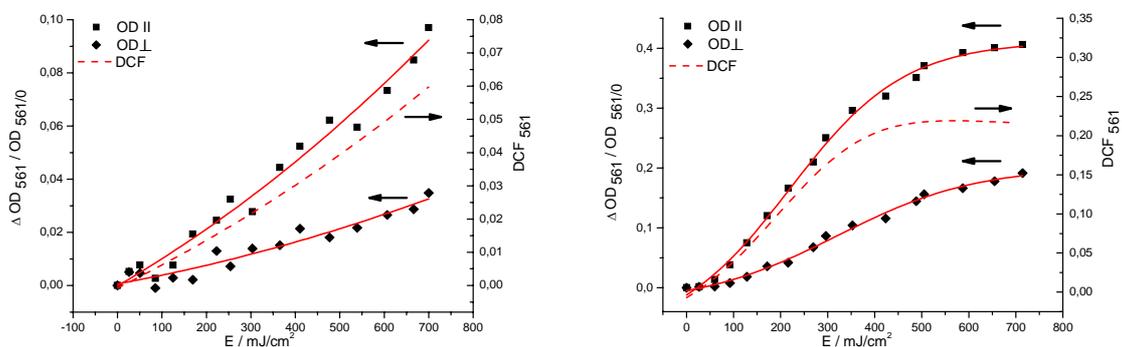


Abb. 81: Relative OD-Änderung und DCF als Funktion der Gesamtenergie der Laserpulse (Methode N2P, WT, OD 0.9, $f = 10$ Hz). Links: 1 Pulsexperiment. Rechts: 10 Pulse im Pulszug.

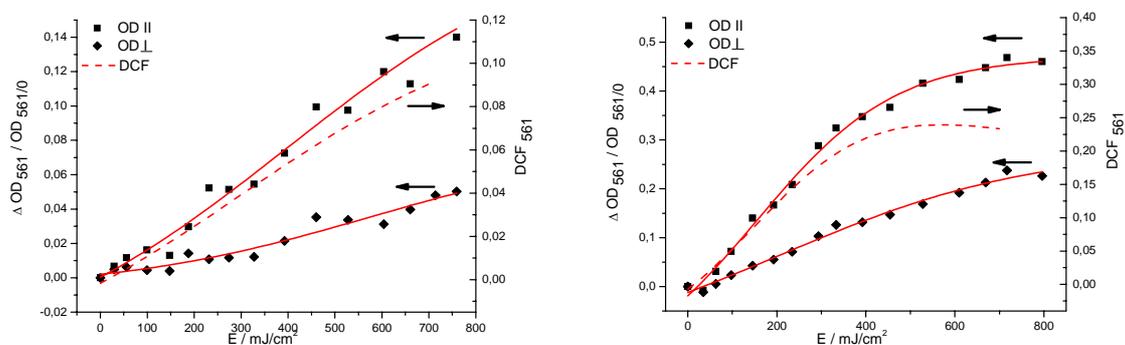


Abb. 82: Relative OD-Änderung und DCF als Funktion der Gesamtenergie der Laserpulse (Methode N2P, WT, OD 0.4, $f = 10$ Hz). Links: 1 Pulsexperiment. Rechts: 10 Pulse im Pulszug.

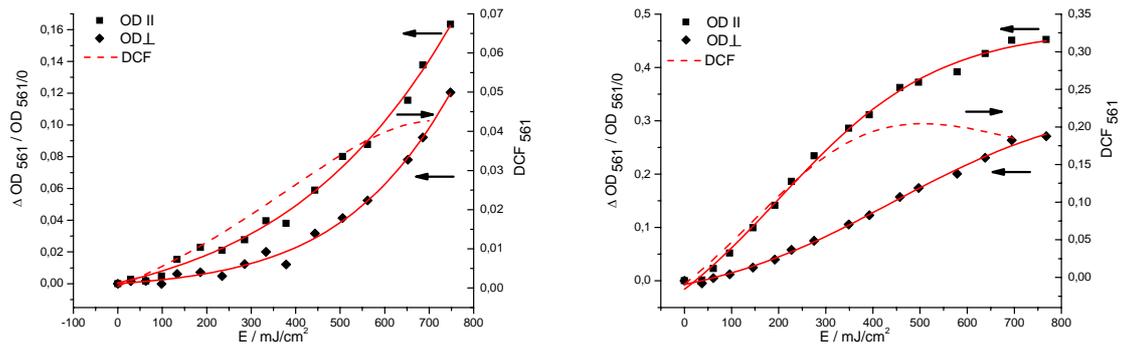


Abb. 83: Relative OD-Änderung und DCF als Funktion der Gesamtenergie der Laserpulse (Methode N2P, D96N, OD 1.1, $f = 10$ Hz). Links: 1 Pulsexperiment. Rechts: 10 Pulse im Pulszug.

Zusammenfassend ist in Tab. 27 der DCF_{\max} bei $\lambda = 561$ nm für die verwendeten Mutanten und die OD der untersuchten Filme dargestellt. Im Rahmen der Messgenauigkeit zeigt sich das die maximal induzierbare relative optische Anisotropie, als DCF_{\max} , naturgemäß keine Funktion der optischen Dichte darstellt. Auch zeigt sich unter den verwendeten Mutanten kein wesentlicher Unterschied. Die maximal induzierbare relative optische Anisotropie mittels ns-Laserpulsen wurde für die Mutanten WT und D96N mit $DCF_{\max/561} \approx 0.22$ bestimmt. Weiterhin ist auch die benötigte Gesamtenergie bis zum Maximum des DCF im Rahmen der hier durchgeführten Messungen keine Funktion der Mutante und der OD des Films.

Tab. 27: $DCF_{\max/561}$ als Funktion der verwendeten Mutante und der OD (Methode N2P, $f = 10$ Hz).

Mutante	OD	Pulszahl	$DCF_{\max/561}$	Energie / J/cm^2
WT	1.5	10	0.20	0.6
WT	0.9	10	0.22	0.5
WT	0.4	10	0.24	0.5
D96N	1.1	10	0.20	0.5

Für die weitere Optimierung der Schreibstrategie, wurde der DCF als Funktion der Pulsanzahl im Pulszug betrachtet. Hier zeigt sich unabhängig von der Pulsanzahl und der Pulsenergie der gleiche DCF_{\max} mit $DCF_{\max/570} = 0.28$. Hierbei ist zu beachten, dass sich aufgrund der Messmethoden (N2P vs. N6P) eine Abweichung zu Tab. 26 ergibt. Nach Abb. 84 gilt, je höher die Energie im Puls desto eher wird der DCF_{\max} erreicht.

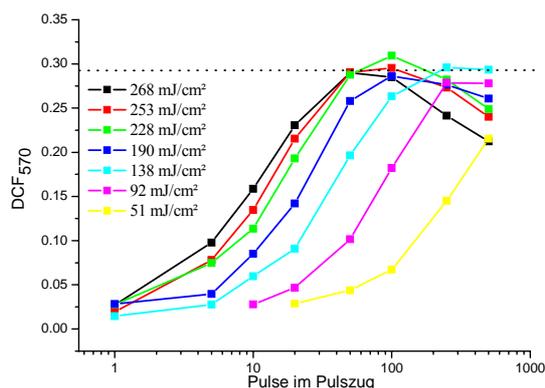


Abb. 84: DCF als Funktion der Pulsanzahl im Pulszug bei variabler Energie im Laserpuls (Methode N6P, WT, OD 1.1, $f = 20$ Hz).

Da der DCF_{\max} keine Funktion der Pulsanzahl und der Pulsenergie ist, ergibt sich als Schreibstrategie für die anisotrope Datenspeicherung in BR ein Optimum bei minimaler Pulsanzahl und maximaler Pulsenergie. Durch diese Vorgehensweise können kurze Schreibzeiten gewährleistet werden, wobei für Pulzüge mit mehr als einem Puls die Pulsfrequenz so gewählt werden muss, dass das, in den Photozyklus angeregte, BR in den Grundzustand B_{570} zurückkehren kann.

Neben der photoinduzierten Anisotropie, wird auch die lokale Farbänderung im Film, die auf die Bildung der Photoprodukte F_{620} und P_{360} zurückzuführen ist, zur Datenspeicherung genutzt (siehe Kapitel 5.3.5). Um die Photodegradation der Chromophorbande des B_{570} -Zustands zu charakterisieren, wurde die Abnahme der OD bei $\lambda = 570$ nm als Funktion der Gesamtenergie bei variabler Pulsanzahl im Laserzug untersucht.

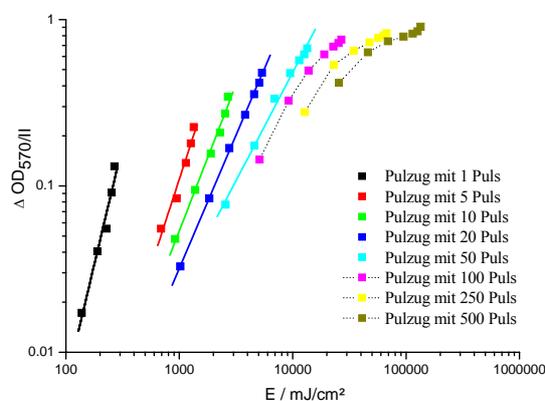


Abb. 85: Relative OD-Änderung als Funktion der Gesamtenergie bei variabler Pulsanzahl im Pulszug (Methode N6P, WT, OD 1.1, $f = 20$ Hz).

In Abb. 85 zeigt sich im doppelt-logarithmischen Plot ein linearer Zusammenhang zwischen OD-Abnahme und Gesamtpulsenergie. Dieser lineare Zusammenhang geht für eine OD-Änderung von ca. $\Delta OD \geq 0.5$ bzw. $\geq 50\%$ der Ausgangs-OD verloren. Im Rahmen der Optimierung der optischen Datenspeicherung ist es somit möglich für eine vorgegebene Pulszuglänge die benötigte Pulsenergie für eine zu erzielende OD-Änderung zu berechnen.

5.3.4.2 Optische Anisotropie durch fs-Laserpulslen

Zur Messung der optischen Anisotropie induziert durch fs-Laserpulse wurde, falls nicht anders angegeben, die OD bei $\lambda = 568$ nm herangezogen (siehe Messmethode 5P).

Bei den Untersuchungen zur relativen OD-Änderung als Funktion der Gesamtenergie der Laserpulse zeigt sich analog zur Photoumwandlung mittels ns-Pulslen, dass die Photokonversion für gleiche Polarisierung von Schreib- und Messstrahl (OD_{\parallel}) effizienter als für orthogonale Polarisierung (OD_{\perp}) abläuft (siehe Abb. 86-Abb. 89). Auch hier zeigte sich ein sigmodaler Fit nach Gleichung (67) als geeignet zur mathematischen Beschreibung der Messdaten. Analog zur Photokonversion mit ns-Pulslen strebt die relative OD-Änderung in den Fits für OD_{\parallel} und OD_{\perp} bei fortschreitender Laserbelichtung unterschiedlichen Maxima entgegen. Der aus den Fits berechnete DCF, also die relative optische Anisotropie, zeigt für die Experimente mit Pulszügen von 20 Pulslen ein deutliches Maximum. Für die Einzelpuls-Experimente wird das DCF-Maximum (DCF_{\max}) nicht immer erreicht. In der optischen Datenspeicherung sind somit je nach gewählter Laserwellenlänge und Pulslänge mehrere Pulse zum Erreichen des Anisotropieoptimums zu verwenden. Eine weitere Kollimierung des Laserstrahls, einhergehend mit einer Steigerung der Leistungsdichte des Pulslen, ist nicht sinnvoll da hier bereits mit einem Spotdurchmesser von $d \approx 50 \mu\text{m}$ eine technisch-sinnvolle untere Größe für die Datenspeicherung erreicht ist.

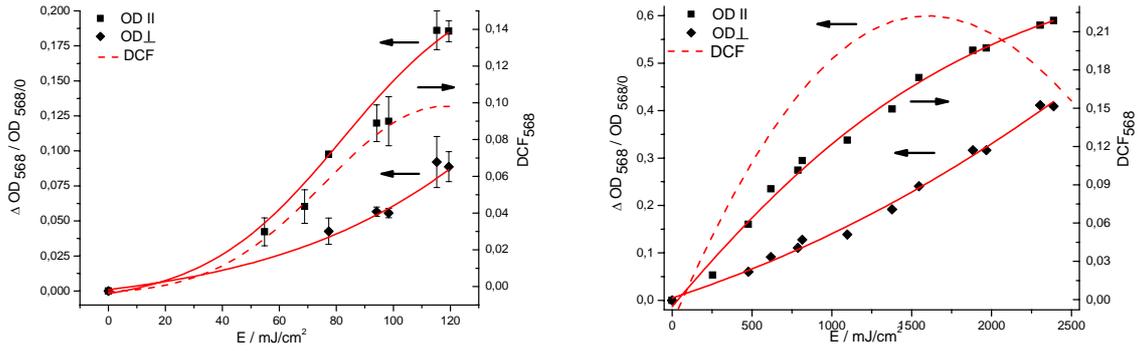


Abb. 86: Relative OD-Änderung und DCF als Funktion der Gesamtenergie der Laserpulse (Methode F5P, D96N, OD 1.5, $f = 1$ kHz, $\lambda = 530$ nm, $t = 175$ fs). Links: 1 Pulseexperiment. Rechts: 20 Pulse im Pulszug.

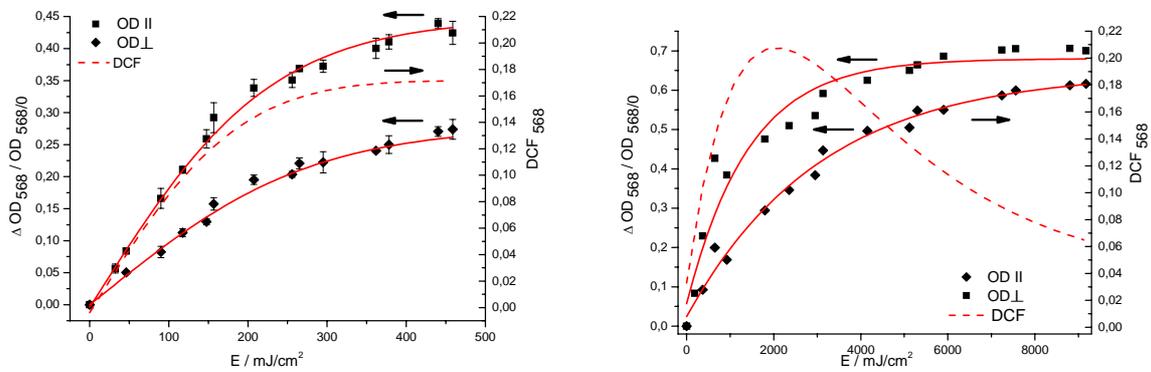


Abb. 87: Relative OD-Änderung und DCF als Funktion der Gesamtenergie der Laserpulse (Methode F5P, D96N, OD 1.5, $f = 1$ kHz, $\lambda = 530$ nm, $t = 52$ fs). Links: 1 Pulseexperiment. Rechts: 20 Pulse im Pulszug.

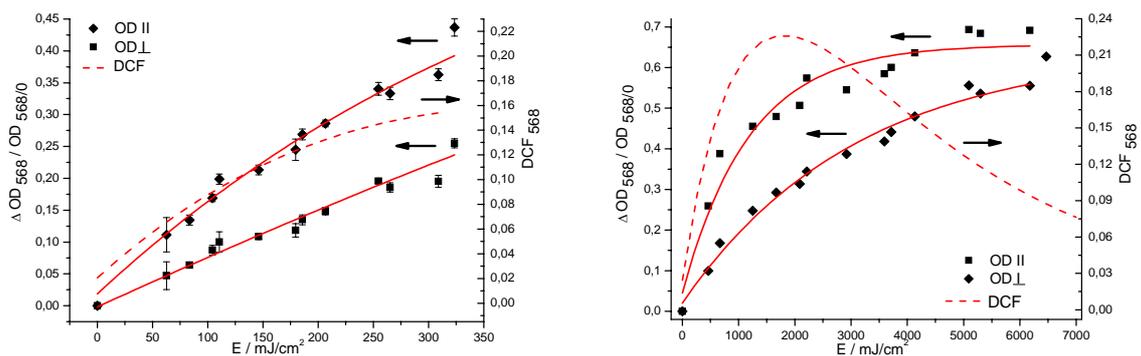


Abb. 88: Relative OD-Änderung und DCF als Funktion der Gesamtenergie der Laserpulse (Methode F5P, D96N, OD 1.5, $f = 1$ kHz, $\lambda = 570$ nm, $t = 46$ fs). Links: 1 Pulseexperiment. Rechts: 20 Pulse im Pulszug.

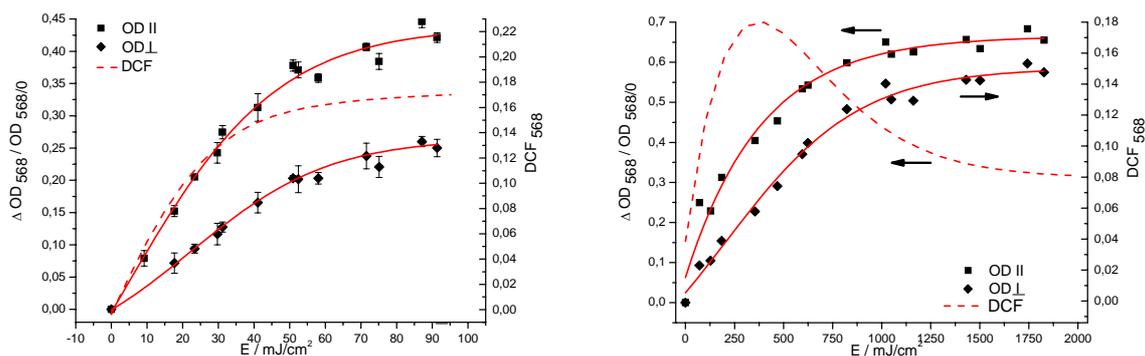


Abb. 89: Relative OD-Änderung und DCF als Funktion der Gesamtenergie der Laserpulse (Methode F5P, D96N, OD 1.5, $f = 1$ kHz, $\lambda = 630$ nm, $t = 33$ fs). Links: 1 Pulseexperiment. Rechts: 20 Pulse im Pulszug.

Tab. 28: $DCF_{\max/568}$ als Funktion der Wellenlänge des Laserlichts, der Pulslänge und der Pulsanzahl im Pulszug (Methode F5P, D96N, OD = 1.5, $f = 1$ kHz).

λ / nm	Pulslänge t / fs	Pulszahl	$DCF_{\max/568}$	Energie / J/cm^2
530	175	1	(0.10)	(0.1)
530	175	2	-	-
530	175	3	0.19	0.4
530	175	5	-	-
530	175	10	0.22	1.1
530	175	20	0.22	1.6
530	52	1	0.17	0.4
530	52	2	0.17	0.5
530	52	3	0.20	0.6
530	52	20	0.21	2.2
570	46	1	-	-
570	46	2	-	-
570	46	3	0.23	0.6
570	46	20	0.23	1.7
630	33	1	0.17	0.1
630	33	2	0.20	0.1
630	33	3	0.19	0.1
630	33	20	0.18	0.4

In Tab. 28 ist der DCF_{\max} bei $\lambda = 568$ nm als Funktion der verwendeten Laserwellenlänge, der Pulslänge und der Pulsanzahl im Pulszug zusammenfassend dargestellt. Im Rahmen der Messgenauigkeit zeigt sich, dass die maximal induzierbare relative optische Anisotropie, als DCF, keine signifikante Funktion der Laserwellenlänge, der Pulslänge und der Pulsanzahl im Pulszug darstellt. Die maximal induzierbare relative optische Anisotropie mittels fs-Laserpulsen wurde für die Mutante D96N mit $DCF_{\max/568} \approx 0.20$ bestimmt. Hingegen ist die benötigte Gesamtenergie bis zum Maximum des DCF eine Funktion der Pulsanzahl im Pulszug. Die Wiederholrate der Pulse beträgt $f = 1$ kHz (siehe Methode F), somit ist davon

auszugehen, dass von Puls zu Puls die in den Photozyklus angeregten BR-Moleküle nicht wieder vollständig im Grundzustand B_{570} vorliegen und somit keine maximale Quantenausbeute für die Photokonversion im Mehrpulsexperimenten gewährleistet werden kann (siehe Kapitel 2.4). Von einem quantitativen Vergleich der benötigten Gesamtenergien wurde aufgrund der hohen Varianz der transversalen Modenform beim Übergang auf andere Wellenlängen und Pulslängen des Lasersystems abgesehen.

5.3.5 Anwendungen von BR als optischer Datenspeicher

Zur Langzeitdatenspeicherung in BR mittels laserinduzierter Photokonversion kann entweder konventionell die lokale Farbänderung durch Bildung der jeweiligen Photoprodukte F_{620} und P_{360} bzw. R_{535} und S_{360} oder die induzierte optische Anisotropie verwendet werden. Die im Folgenden vorgestellten Anwendungen eines BR-basierten WORM-Speichers nutzen die Anisotropie zur Datenspeicherung ^[129-132]. Zur Datenspeicherung wurden ein paralleler und ein sequenzieller Schreibvorgang etabliert (siehe Methode P & S). Die optische Speicherung erfolgte mittels ns-Laserpulsen, da dieses Lasersystem in der Arbeitsgruppe zur direkten Verfügung stand. Prinzipiell sind die hier exemplarisch vorgestellten Anwendungen allerdings auch mit fs-Laserpulsen durchführbar.

Im Kontrast zu den gängigen anderen Technologien, wie z.B. CD-Rs, die nur über eine binäre Speichermöglichkeit verfügen, ergeben sich über die induzierte Anisotropie für eine Speicherstelle mehr als zwei Zustände.

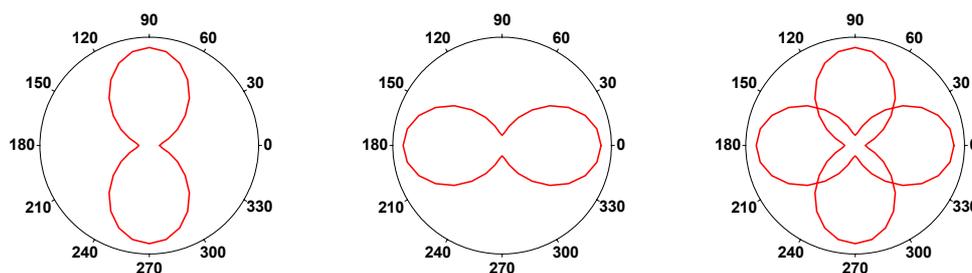


Abb. 90: Schematische Darstellung zur Datenspeicherung mittels Anisotropie in BR-Filmen. Links: Bit mit der Information "0". Mitte: Bit mit der Information "1". Rechts: Bit mit der Information "0" & "1".

Daten im BR-Film werden durch die Orientierung der laserinduzierten optischen Anisotropie, die durch eine winkelabhängige Änderung der Absorption bzw. des Refraktionsindex hervorgerufen wird, gespeichert. Für zwei lineare orthogonale Polarisationszustände des

Schreiblasers, ergeben sich drei Speicherzustände (Abb. 90). Eine digitale "0" und "1" ergeben sich aus der jeweiligen Polarisation des Laserstrahls. Durch Superposition der beiden Polarisationszustände ergibt sich ein dritter Speicherzustand, der sowohl die Information "1", als auch die Information "0" trägt. Wird der Winkel zwischen den Polarisationszuständen $< 90^\circ$ gewählt, ergeben sich entsprechend mehr Speicherzustände, bei gleichzeitiger Abnahme des Signal-Rausch-Verhältnisses. Für die hier vorgestellten Beispiele zur Datenspeicherung in BR-Filmen wurden maximal drei Zustände pro Speicherstelle benötigt, und somit orthogonale Polarisationszustände des Schreiblasers verwendet.

In jedem Fall ergibt sich durch die Speicherung einer Information eine Farbänderung im Film, somit sind gespeicherte Informationen leicht von freien Speicherstellen zu unterscheiden. Dadurch entfällt eine Formatierung des Mediums und der Anspruch an mechanische Toleranzen für den Lese- und Schreibprozess sind geringer als bei binären Speichertechnologien. Da die gespeicherte Information sich nur in der Orientierung der induzierten Anisotropie unterscheidet, kann die im Datenspeicher erhaltene Information nur mittels linear-polarisierten Lichts ausgelesen werden. Für ein auf den BR-WORM-Speicher basierendes Sicherheitselement erhöht sich somit zusätzlich der Fälschungsschutz, da zur Fälschung z.B. kein einfacher Druck verwendet werden könnte, da dieser nicht über anisotrope Eigenschaften verfügen würde. Zusätzlich ergibt sich durch die Irreversibilität des Datenspeichers auch eine hohe Integrität der Daten, denn letztendlich lassen sich die einmal gespeicherten Daten nicht mehr ohne Zerstörung verändern.

Abb. 91 & Abb. 92 zeigen in BR-Filmen gespeicherte Mikrobilder. Die Bilder wurden mit Hilfe eines optischen Polarisationsmikroskops aufgenommen (siehe Kapitel 3.7.1). Die Größe der Bilder beträgt ca. 2 mm x 2 mm mit einer Pixelgröße von 9.5 μm . Ausgehend von dieser Pixelgröße ergibt sich eine Speicherdichte von 135 kB/cm². Die Speicherdichte liegt weit unterhalb der in BR theoretisch erreichbaren Speicherdichte von 5,000 Linien/mm ^[10], übertrifft allerdings die Speicherdichte gängiger Magnetkarten um ein Vielfaches. Die Speicherdichte wird im Wesentlichen durch die verwendete Optik limitiert. Um die Datenlesbarkeit mit preiswerten Plastikoptiken zu gewährleisten, ist die hier gewählte Pixelgröße als geeignet anzusehen.

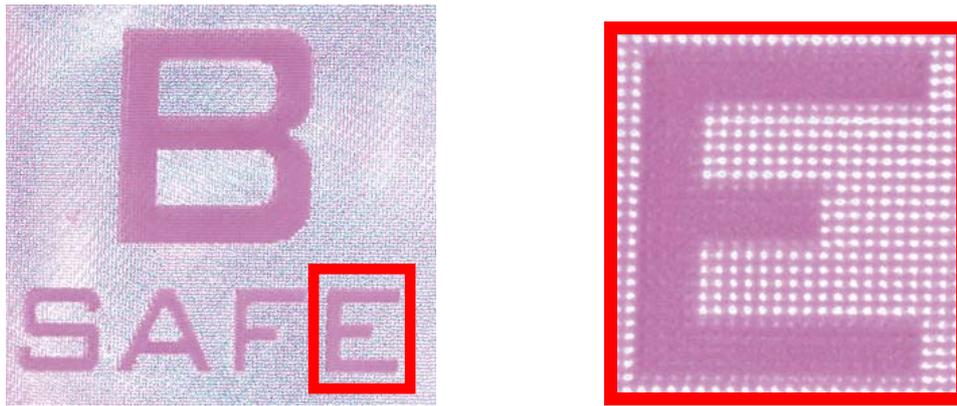


Abb. 91: In BR gespeicherte Mikrobilder (Methode P, WT, OD 1.6, $E = 7 \text{ J/cm}^2$, $f = 10 \text{ Hz}$).

Abb. 91 zeigt das in BR gespeicherte B-SAFE[®]-Logo. Dieses Logo wurde im Rahmen des, unter Mitarbeit der Arbeitsgruppe Prof. Hampp durchgeführten, BMBF-Projekts (FKZ 13N8196) als Überbegriff des auf Bakteriorhodopsin basierenden multifunktionalen Sicherheitskonzepts gewählt. In der Ausschnittsvergrößerung zeigt sich deutlich die Pixelstruktur der Speicherstellen.

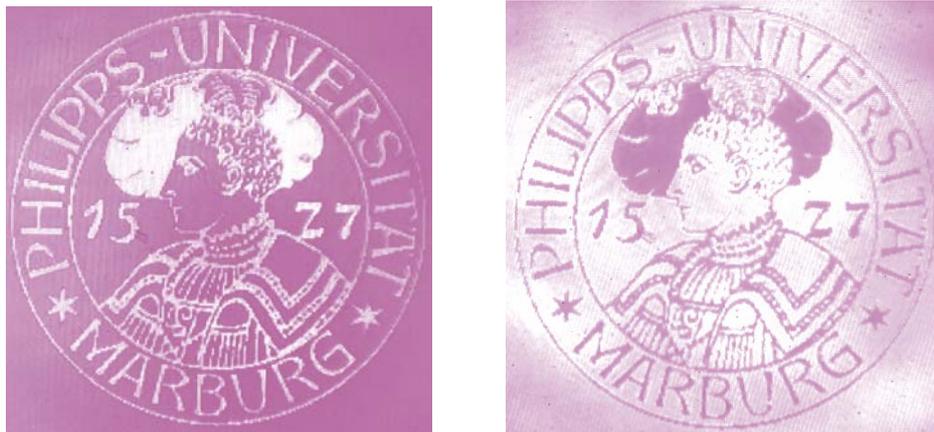


Abb. 92: In BR gespeicherte Mikrobilder (Methode P, WT, OD 1.6, $E = 7 \text{ J/cm}^2$, $f = 10 \text{ Hz}$).

Abb. 92 zeigt das Siegel der Philipps-Universität Marburg. Die beiden Bilder wurden vom gleichen Datensatz unter unterschiedlichen Polarisierungen aufgenommen. Jede Speicherstelle fungiert somit durch die induzierte Doppelbrechung als wellenlängenabhängiger Phasenschieber bezüglich der Polarisation des einfallenden Messlichts. Die photoinduzierte Anisotropie führt also letztendlich zu einer lokal-induzierten Doppelbrechung innerhalb des Films (siehe Gleichung (68)). Somit kann abhängig von der Position des bzw. der Polarisationsfilter im Messstrahlengang das gespeicherte Bild "normal" oder "invertiert" wahrgenommen werden.

Durch die Erzeugung eines dritten Speicherzustands durch Überlagerung der Zustände "1" und "0" wird es möglich einen Datensatz durch Superposition mit einem zweiten Datensatz zu verschlüsseln. Hierbei wird bitweise der Klartext durch einen gleich langen Schlüssel chiffriert. Wird als Schlüssel ein mittels Zufall erzeugter Datensatz verwendet, wird das Verfahren als One-Time-Pad bezeichnet und gilt als einzig beweisbar sicherer Verschlüsselungsalgorithmus ^[155]. Diese Chiffriertechnik wird üblicherweise wegen des hierbei entstehenden großen Datenvolumens nur für Anwendungen mit höchstem Sicherheitsbedarf eingesetzt. In BR sinkt die Datendichte durch diese Verschlüsselungstechnik nicht, da hier wie beschrieben mehr als zwei Zustände an einer Stelle gespeichert werden können.

Tab. 29: Verschlüsselung von Datensätzen in BR nach dem One-Time-Pad-Verfahren ^[155].

Datenbit	1		0	
Kryptobit	1	0	1	0
geschriebenes Bit	1	?	?	0

Für die Verschlüsselung ergibt sich für identische Daten- und Kryptobits, dass die induzierte Anisotropie bzw. die Information des Datenbit unverändert bleibt. Weichen Daten- und Kryptobit voneinander ab, wird die photoinduzierte Anisotropie an der Speicherstelle durch Superposition der beiden Bits gelöscht. Dieser Zustand wird im Folgenden mit "?" bezeichnet und an dieser Speicherstelle kann nicht mehr ohne bekannten Schlüssel zwischen Daten- und Kryptobit unterschieden werden (siehe Tab. 29). Dadurch, dass die Schlüssellänge der Klartextlänge entspricht, ergeben sich statistisch eine Vielzahl solcher "?"-Zustände. Ausgehend davon, dass in je 4-bit, also in jeder Hexnummer, ein "?"-Zustand erzeugt wird, ergibt sich für einen 1 kB Klartext, entspricht 2048 Hexzahlen, 2^{2048} mögliche Lösung für einen Dechiffrierungsangriff.

Im Folgenden wurde als Beispiel der Klartext "290673" mit dem Schlüssel "130202" chiffriert. Hierzu wurden die einzelnen Nummern der Zahlen entsprechend ihres Hexwertes in Binärcode übersetzt und der chiffrierte Datensatz durch Superposition der beiden binär Datensätze erzeugt (siehe Tab. 30).

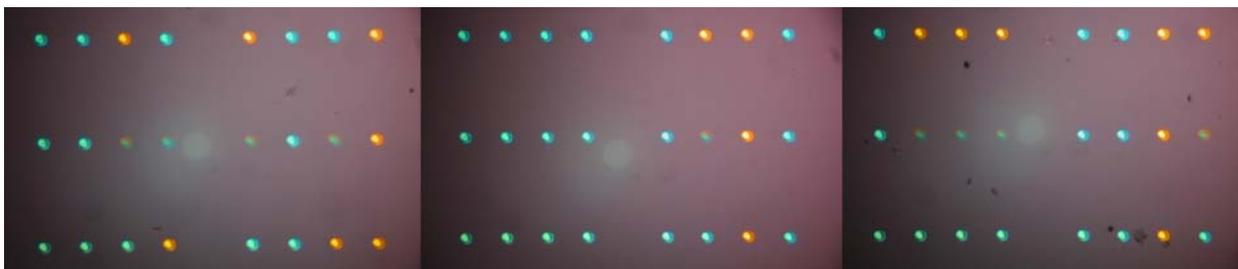
Tab. 30: Beispiel der Chiffrierung des Klartexts "290673" mit dem Schlüssel "130202" nach dem One-Time-Pad-Verfahren.

Datensatz Klartext	2	9	0	6	7	3
	0010	1001	0000	0110	0111	0011
codierter Datensatz	00??	?0?1	0000	0?10	0???	001?
Datenschlüssel	0001	0011	0000	0010	0000	0010
	1	3	0	2	0	0

Abb. 93 & Abb. 94 zeigen das Beispiel aus Tab. 30 gespeichert in einem BR-Film mittels seriellen Schreibvorgang (Methode S). Der Spotdurchmesser für eine Speicherstelle liegt bei $d = 60 \mu\text{m}$. Die obere Reihe repräsentiert den Klartext-Datensatz "290673" und die untere den Datenschlüssel "130202" jeweils in Binärcode. Die mittlere Reihe, der codierte Datensatz, ergibt sich durch Superposition des oberen und unteren Datensatzes. Der Speicherzustand "0" wurde bei einer Polarisation des Schreiblasers von 0° und der Zustand "1" bei 90° geschrieben. Da sich nach der Kramers-Kronik-Relation (siehe Gleichung (68))^[156] neben der Absorption auch der Brechungsindex in der Speicherstelle durch Laserbelichtung ändert, zeigen sich im Polarisationsmikroskop (siehe Kapitel 3.7.1) für die Speicherzustände "0" und "1" unterschiedliche Farben (siehe Abb. 93).

$$\Delta n(\lambda, I) = \frac{\ln 10}{2n_0\pi^2 d} \int_0^\infty \frac{\Delta OD(\lambda', I)}{1 - (\lambda'/\lambda)^2} d\lambda' \quad (68)$$

mit n Brechungsindex
 d Dicke des Films

**Abb. 93:** In BR gespeicherter Datensatz (siehe Tab. 30) aufgenommen unter 45° (Methode S, D96N, OD 1.7, $E = 2.7 \text{ J/cm}^2$, $f = 10 \text{ Hz}$).

Zum parallelen optisch-maschinellen Auslesen der codierten Daten kann eine Monochromkamera mit entsprechender Polarisationsoptik verwendet werden. Wie Abb. 94 zeigt, werden mit einem solchen Aufbau hohe Kontraste, also ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis und damit eine hohe Integrität des Lesevorgangs erreicht.



Abb. 94: In BR gespeicherter Datensatz (siehe Tab. 30) (Methode S, D96N, OD 1.7, $E = 2.7 \text{ J/cm}^2$, $f = 10 \text{ Hz}$). Oben: Aufnahme unter 45° . Mitte: Aufnahme unter 0° . Unten: Aufnahme unter 90° .

5.3.6 Zusammenfassung

Im vorliegenden Kapitel wurde die irreversible photochemische Konversion von BR durch Belichtung mit ns- und fs-Laserpulsen untersucht. Mittels UV/vis-spektroskopischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass in Filmen die gleichen Photoprodukte, wie bereits für Suspension in der Literatur beschrieben sind, gebildet werden (siehe Tab. 22). Die Produkte wurden mit F_{620} und P_{360} für die Photokonversion durch ns-Pulse bzw. mit R_{535} und S_{360} für die Umwandlung durch fs-Pulse bezeichnet. Wobei die Indizes das Absorptionsmaximum der Photoprodukte in nm angeben. Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente zusammenfassend, kann festgestellt werden, dass die Umwandlung von B_{570} in F_{620} mittels ns-Pulsen durch einen resonanten Zweiphotonenprozess bzw. sequenziellen biphotonischen Prozess erfolgt, wobei die Photokonversion innerhalb des absorbierenden BR-Moleküls stattfindet. In einem weiteren photoinduzierten Prozess wird das gebildete F_{620} in das Produkt P_{360} umgewandelt (siehe Abb. 70). Durch massenspektrometrische

Untersuchungen konnte weiterhin die These gestützt werden, dass im P_{360} eine reduzierte Schiffsbasis vorliegt. Konträr zu den in der Literatur beschriebenen Untersuchungen an Suspensionen kann im Film durch Unterbindung der Diffusion mittels photochemischer Konversion von BR eine optische Anisotropie erzeugt werden. Die induzierbare Anisotropie wurde als Funktion der BR-Mutante, der Pulsanzahl im Pulszug, der Pulsenergie und der OD untersucht. Die maximal induzierbare relative optische Anisotropie (DCF_{\max}) mittels ns-Laserpulsen wurde für die Mutanten WT und D96N mit $DCF_{\max/561} \approx 0.22$ bestimmt. Der DCF mittels fs-Laserpulsen wurde für die Mutante D96N mit $DCF_{\max/568} \approx 0.20$ bestimmt. Hierbei zeigt sich, dass der DCF_{\max} keine Funktion der Pulanzahl im Pulszug, der Pulsenergie und der OD ist. Die zum Erreichen des DCF_{\max} benötigte Gesamtenergie ist gleich, solange die Wiederholfrequenz der Einzelpulse niedrig genug ist, dass zwischen zwei Pulsen das in den Photozyklus angeregte BR in den Grundzustand B_{570} zurückkehren kann. Um den benötigten Zeitraum zwischen zwei Pulsen zu minimieren und damit die Konversionsgeschwindigkeit zu erhöhen, wäre unter Nutzung des photochemischen Übergangs von M_{410} nach B_{570} die Bestrahlung der Probe mit Licht im blauen Bereich des Spektrums denkbar. Ausgehend von der induzierbaren Anisotropie wurde ein BR-basierter optischer WORM-Speicher entwickelt. Durch die winkelabhängige Orientierung der optischen Anisotropie im BR-Film ist es möglich drei Speicherzustände in einer Speicherstelle zu realisieren (siehe Abb. 90). Durch die Erzeugung eines dritten Speicherzustands durch Superposition ist es möglich einen Klartextdatensatz mittels Superposition eines zweiten Schlüsseldatensatzes zu verschlüsseln. Dieses als One-Time-Pad bezeichnete Verfahren bietet eine maximale Sicherheit, ohne dass die Datendichte durch diese Verschlüsselungstechnik sinkt, da hier wie beschrieben gegenüber klassischen Speichertechniken mehr als zwei Zustände an einer Stelle gespeichert werden können. Mittels einfachen optischen Aufbauten konnte mit 135 kB/cm^2 eine Speicherdichte im BR-Film erreicht werden, die die Speicherdichte gängiger Magnetkarten um ein Vielfaches übertrifft.

6 BR in Bio-Hybrid- und Hybrid-Bio-Systemen

6.1 Einleitung

Durch Kombination bestehender Teilbereiche der Nano- und Mikrotechnologie ergeben sich neue Forschungs- und Anwendungsbereiche die durch Nutzung des in den jeweiligen Teilbereichen gewonnen Wissens hohe synergetische Effekte zeigen. Im Rahmen dieser Arbeit sollen Grundlagen und Konzepte für die Verwendung des Biosystems Bakteriorhodopsin in Biohybrid- und Hybridbio-Systemen aufgezeigt werden (siehe Abb. 95). Biohybrid-Systeme sind durch die modulare Integration von biologischen und mikroelektronischen Systemen gekennzeichnet. Hybridbiosysteme hingegen entstehen durch Kombination verschiedener Biosysteme.

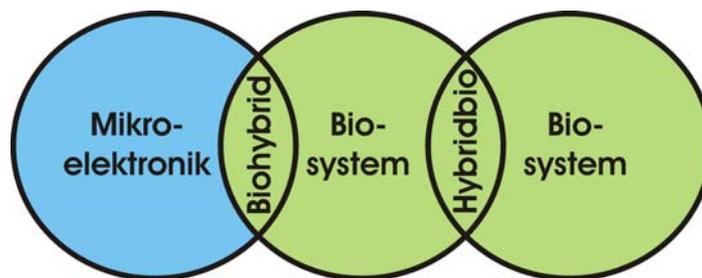


Abb. 95: Biohybrid- und Hybridbio-Systeme ergeben sich aus den Schnittmengen von Mikroelektronik und Biosystemen.

6.2 BR in Bio-Hybrid-Systemen

6.2.1 Einleitung

Das momentane Hauptanwendungsgebiet für biohybride Technologien liegt bei den Biochips. Durch die Anbindung spezifischer Biomakromoleküle (DNA, Lipide, Proteine, bzw. Antikörper) auf Arrays entstehen komplette „labs-on-chip“, die z.B. die Protein- und DNA/RNA-Analyse im Hochdurchsatz ermöglichen. Dieser Markt wird aktuellen Prognosen zufolge auf bis zu 5 Mrd. US\$ jährlich wachsen ^[157]. Somit zeigt sich, dass in der Bio- (medizinischen) Forschung die Anbindung von Biomolekülen, Zellorganellen und Zellen auf mikroelektronischen Strukturen und Halbleitermaterialien immer wichtiger wird. Bei der für eine Integration in die Mikroelektronik nötigen Positionierung und Fixierung von nanoskaligen Funktionselementen auf Elektrodenarrays zeichnet sich ein generelles Problem ab. Die Methode des klassischen Verbindungsaufbaus in der Mikroelektronik - Pick and Place

mit anschließenden Bonden bzw. Kleben ^[158] - versagt für diese Aufgabenstellung und somit besteht die Notwendigkeit neue Verfahren zur Integration von Mikro- und Nanokomponenten in die Mikroelektronik zu entwickeln und unter dem Blickwinkel technologischer Kompatibilität zu erproben.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen die Grundlagen einer neuen Montagetechnik zur Positionierung und Fixierung von Mikro- und Nanokomponenten erarbeitet werden. Unter Erschließung von Phänomenen der Selbstorganisation (Self-Assembly) wird beispielhaft die seitenspezifische Belegung von Elektrodenoberflächen mit Purpurmembra angestrebt. Am konkreten Beispiel der Thiol-Gold-WW (ausgewählte Bindungsart) und des optoelektronisch aktiven Biomaterials Purpurmembra (ausgewähltes Bauteil) soll versucht werden, eine möglichst geschlossene einlagige Schicht Purpurmembra auf metallischen Elektrodenoberflächen seitenspezifisch abzuscheiden (siehe Abb. 96) ^[158].

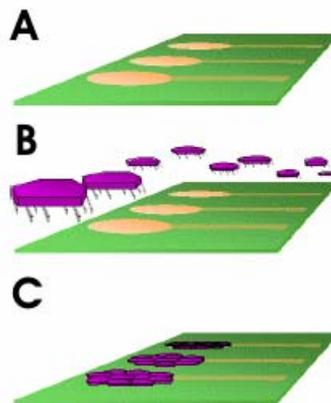


Abb. 96: Konzept der Montage von PM auf Gold-Elektroden durch Selbstorganisation. Abb. aus ^[158].
A: Elektrodenarray. B: Inkubation mit PM-Suspension C: Elektrodenarray nach erfolgter Assemblierung.

Durch den hohen Entwicklungsgrad der Molekularbiologie und synthetischen Chemie steht für die Vielzahl der möglichen Mikro- und Nanokomponenten ein breites Spektrum von Techniken zur zielgerichteten chemischen Modifikation zur Verfügung, so dass das hier vorgestellte Montagekonzept leicht auf andere Systeme übertragen werden kann. Weiterhin ist auch der Einsatz der Purpurmembra selbst als Interface zwischen Substrat und Nanokomponente denkbar (siehe Kapitel 7.2).

6.2.2 Adaption von PM zum Einsatz als Nanobauteil

Wildtyp PM bzw. Typ D96N verfügt über keine Thiolfunktionalität. Somit sind geeignete Methoden zur Modifikationen der Purpurmembran auszuwählen und vorzunehmen, die in eine – bezogen auf das Purpurmembran-Blatt – seitenspezifische Thiol-Funktionalisierung des Proteins münden. Dabei ist insbesondere die sterische Zugänglichkeit der eingeführten Gruppen zu berücksichtigen.

Die seitenspezifische Thiol-Funktionalisierung der Purpurmembranfragmente kann durch geeignete biochemische oder molekulargenetische Modifikationen durchgeführt werden. Beide Ansätze sollen im Folgenden diskutiert werden:

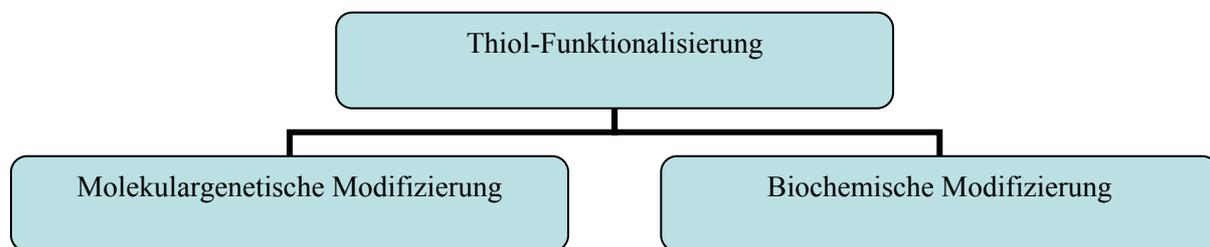


Abb. 97: Schematische Gliederung der Methoden zur Funktionalisierung von PM

Die Molekulargenetische Modifizierung erfolgt durch Austausch einer sterisch zugänglichen Aminosäure mit Cystein mittels Punktmutation. Sterisch zugängliche Aminosäuren sind in den Termini und den Loops zu finden. Als geeignete Mutante ist D36C aus der Literatur^[159] bekannt und verfügbar. Der biochemischen Modifizierung liegt die Einführung einer Thiolfunktion als Kopfgruppe eines biochemischen Linkers, der kovalent und spezifisch an eine Aminosäure im BR bindet, zugrunde. Geeignete funktionelle Gruppen für die Kopplung des Linkers an die PM sind NHS (N-hydroxy-succinimid) und ITC (Isothiocyanat)^[160, 161]. Die bevorzugte Kopplungsstelle im BR ist das Lysin K129 (siehe Kapitel 6.3). Als geeigneter Linker ist DSU (Dithiobis(succinimidyld-undecanoat))^[162] kommerziell erhältlich.

Im Rahmen der BMBF Projektstudie "Bio-Mount"^[158] wurde der Arbeitsansatz "molekulargenetische Modifizierung" in Verbindung mit der vorliegenden Doktorarbeit durchgeführt^[163]. Der Ansatz "biochemische Modifizierung" wurde am Fraunhofer IZM bearbeitet und wird hier nicht näher dargestellt^[164].

Für die folgenden Experimente wurden Purpurmembranfragmente der gentechnisch erzeugten Mutanten D36C und D96N verwendet (siehe Kapitel 3.1.1). Die PM vom Typ D36C wurde durch Reduktion mit Tributylphosphin entschützt und die Aktivität der Thiol-Bindungseinheiten mittels CPM-Label nachgewiesen (siehe Kapitel 3.1.1.5). In der Literatur ^[4] wird beschrieben, dass Phosphine ein Selbstassemblierungsverhalten auf edlen Metallen zeigen können. Um den Einfluss des PBU₃ auf das Assemblierungsverhalten von D36C auf Gold zu untersuchen, wurden mehrere Probensätze mit und ohne PBU₃ miteinander verglichen. Bei keinem der Probensätze wurde eine Beeinflussung der Assemblierung des D36C auf Gold durch Entfernen des PBU₃ nach dem Entschützen festgestellt. Um zu zeigen, dass CPM (7-Diethylamino-3-(4'-maleinimidylphenyl)-4-methyl-coumarin) ein spezifisches Substrat für die Thiolgruppe ist und somit die Aktivitätsbestimmung mittels CPM zu legitimieren, wurden LC/MS Untersuchungen an CPM-gelabeltem D36C durchgeführt. Ein LC/MS/MS-Lauf des bromcyanverdauten BR zeigt deutlich das Ionensignal für das mit CPM gelabelte Fragment. Es wurden keine weiteren Fragmente mit CPM-Label gefunden (siehe Kapitel 6.3.3.2). Es ist also von einer spezifischen Reaktion von CPM mit der Cysteingruppe des D36C auszugehen.

Nach dem Auftauen der PM vom Typ D36C zeigte sich, dass diese aufgrund ihrer gegenüber WT geänderten Suspensionseigenschaften zu starker Aggregation neigt. Die Aggregatbildung ist hierbei so stark, dass die Suspension sich in diesem Zustand nicht zur Adsorption an Goldoberflächen eignet. Zur Homogenisierung der Proben wurden die zuvor entwickelten Verfahren mittels French-Press und Ultraschallsonde eingesetzt werden (siehe Kapitel 4.3). Die Homogenisierung erfolgte aufgrund der geringen Probenmengen mit der Ultraschallsonde (siehe Kapitel 3.1.1.3) vor dem Entschützen. Um die Vergleichbarkeit von Experimenten mit D36C und D96N zu gewährleisten, wurden auch die verwendeten D96N Proben homogenisiert und der Entschützungsreaktion unterzogen.

Durch die mit der Homogenisierung einhergehenden Teilchengrößeneinstellung, hinzu monodispersen und kleineren PM-Patches, ist weiterhin mit einer Optimierung des Belegungsgrads und mit kürzeren Abscheidungszeiten zu rechnen, da kleine PM Fragmente zu einer homogenen Bedeckung der zu adressierenden Areale mit PM führen und über eine höhere Beweglichkeit in der Suspension verfügen.

6.2.3 Evaluierung der Substrate

Zur topographischen Analyse der Substrate wurde die Rasterelektronen- (REM) (siehe Kapitel 3.7.2) und die Rasterkraftmikroskopie (AFM) (siehe Kapitel 3.7.3) evaluiert. Eine Betrachtung der REM-Bilder zeigt, dass mittels dieser Methode nur eine qualitative Beurteilung der Metalloberflächen möglich ist. Weiterhin ergibt sich, dass die Auflösung des REM nur zur Identifizierung von "makroskopischen" Störstellen, wie Kratzer, größeren Staubpartikeln und Fabrikationsfehlern geeignet ist. Eine Beurteilung der Rauheit ist hier nicht möglich. Untersuchungen mittels REM wurden deshalb nur exemplarisch durchgeführt, da keine Quantifizierung der Oberflächenrauheit möglich ist und der Probendurchsatz limitiert ist.

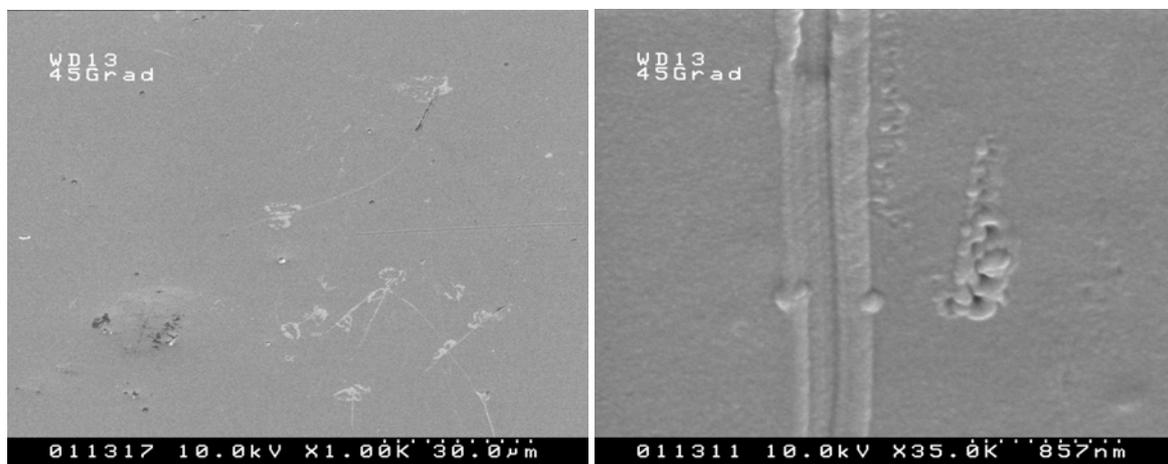


Abb. 98: REM-Aufnahmen eines LPKF-Substrats vom Typ Kapton-Gold. Links: Vergrößerung 1,000x. Rechts: Vergrößerung 35,000x.

Die Evaluierung der Topographie mittels AFM hingegen ist quantitativ. Die Oberflächenrauheit wird anhand des Area Ra Wertes beschrieben. Der Area Ra Wert ist das arithmetische Mittel der Abweichungen von der mittleren Höhe (über die Fläche betrachtet).

Die untersuchten Substrate lassen sich in vier Kategorien einteilen:

1. 1,1,1-Gold auf Glimmer (Plano GmbH, Wetzlar)
2. Template-stripped-Gold (TSG) auf Floatglas (siehe Kapitel 3.4)
3. Gold auf Siliziumwafer (Georg Albert PVD-Beschichtungen, Heidelberg)
4. kommerzielle Substrate (LPKF, Garbsen)
 - a. Kapton + Gold
 - b. Kapton + Kupfer (elektrochemisch verstärkt mit Kupfer, Nickel und Gold)
 - c. dekaptierte Substrate, der Typen a. & b.

Exemplarisch sind zur Visualisierung AFM Aufnahmen der verschiedenen Substratkategorien dargestellt:

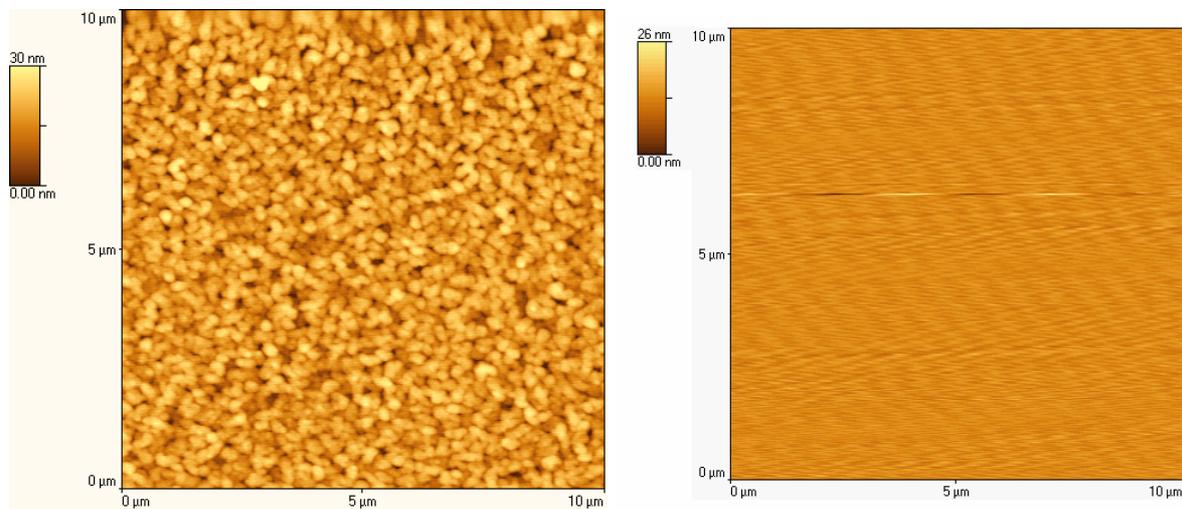


Abb. 99: AFM Aufnahmen von Substraten. Links: Typ 1 (1,1,1-Au). Rechts: Typ 3 (Au auf Si).

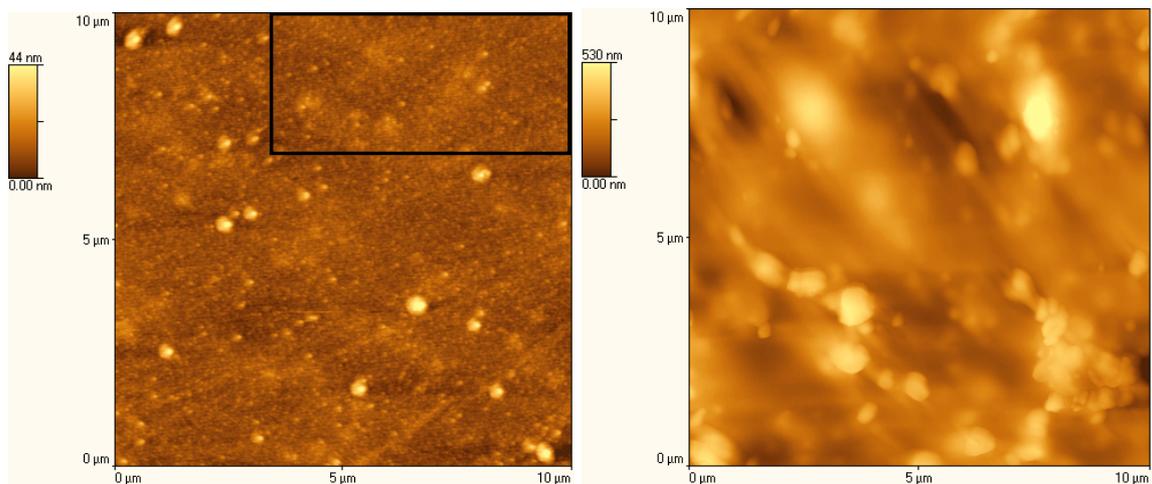


Abb. 100: AFM Aufnahmen von Substraten. Links: Typ 4a (75 μm Kapton, 80 nm Au) (Fläche innerhalb des schwarzen Rechteck entspricht Messfläche für Area RA Wert). Rechts: Typ 4c (75 μm Kapton, 80 nm Au, dekaptiert).

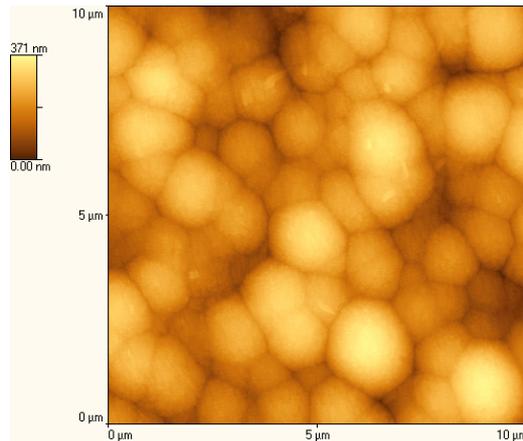


Abb. 101: AFM Aufnahmen von Substraten. Typ 4b (75 μm Kapton, 50 nm Cu, 2 μm Cu, 3 μm Ni, 0.2 μm Au).

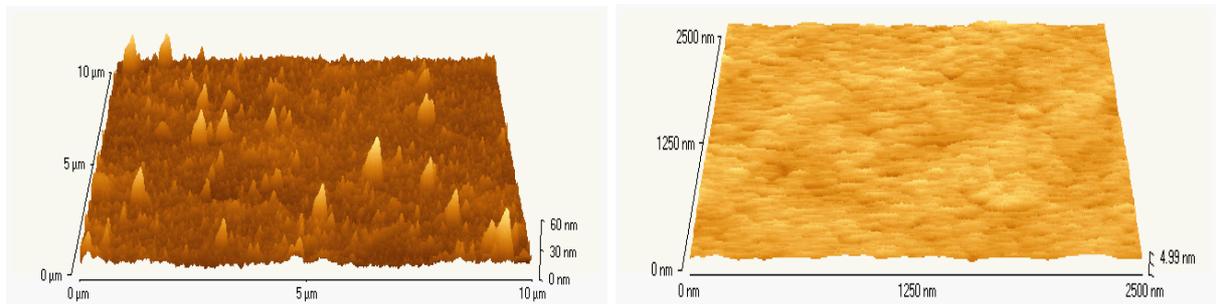


Abb. 102: AFM Aufnahmen von Substraten. Links: Typ 4a (75 μm Kapton, 80 nm Au). Rechts: Typ 2 (TSG-Au).

In Tab. 31 sind die aus den AFM-Messungen ermittelten Area Ra Werte zusammengefasst.

Tab. 31: Oberflächenrauheit verschiedener Gold-Substraten aus AFM-Untersuchungen.

Probentyp	Material	Area Ra / nm
Typ 1 (siehe Abb. 99)	1,1,1-Gold auf Glimmer	4.0905
Typ 2 (siehe Abb. 102)	Template-stripped-Gold	0.3326
Typ 3 (siehe Abb. 99)	Gold auf Siliziumwafer	0.8966
Typ 4a	Kapton-Gold	4.4641
Typ 4a	Kapton-Gold	3.0481
Typ 4a (siehe Abb. 100)	Kapton-Gold	2.2601
Typ 4b (siehe Abb. 101)	Kapton-Cu-Cu-Ni-Au (elektrochem. verst.)	55.0653
Typ 4c	Kapton-Gold (dekaptiert)	41.7206
Typ 4c	Kapton-Gold (dekaptiert)	7.08914
Typ 4c	Kapton-Gold (dekaptiert)	23.3710
Typ 4c	Kapton-Gold (dekaptiert)	4.4082
Typ 4c (siehe Abb. 100)	Kapton-Gold (dekaptiert)	61.1062

Zunächst sollen die LPKF-Substrate untereinander verglichen werden. Die niedrigsten Area Ra Werte zeigen die Kapton-Gold-Proben. Die verstärkte Probe zeigt zwar keine Spikes, wie sie in den unverstärkten Proben häufig beobachtet werden konnten (siehe Abb. 102), dafür aber mit Abstand die höchsten Rauheitswerte. Somit sollten sich bezüglich der Rauheit der Oberfläche die unverstärkten Kapton-Gold-Proben leichter mit PM beschichten lassen. Bei einer Betrachtung der Oberflächen der LPKF-Substrate im Lichtmikroskop zeigte sich, dass die Oberflächen teilweise Verunreinigungen, wie z.B. Fett von Fingerabdrücken und Staub, aufweisen. Eine Reinigung der Oberfläche mit EtOH war nicht immer voll zufrieden stellend. Zur Reinigung der Oberflächen wurde eine kommerzielle Dekaptierlösung (Fraunhofer IZM, Berlin) evaluiert. Die Vermessung der neuen Probenchargen (dekaptierte Oberflächen) zeigte, dass die verwendete Reinigungsmethode zu einer Erhöhung der Oberflächenrauheit führt. Es wird angenommen, dass die in der Dekaptierlösung vorhandenen Säuren die Oberfläche partiell anlösen und es so zu einer Verschlechterung der Oberflächenplanarität kommt. Abschließend bleibt anzumerken, dass diese Methode nicht zur Reinigung der Oberflächen geeignet ist. Auf eine zum EtOH zusätzliche Reinigung der Oberfläche wurde deshalb verzichtet. Abschließend zeigt sich, dass die Gold-Kapton-Oberflächen vom Typ 4a bereits weitgehend planar sind, allerdings nicht die benötigte durchschnittliche Rauheit der Oberfläche von nicht mehr als einigen Angström bezogen auf eine Fläche von mindestens $5 \mu\text{m}^2$ aufweisen ^[162]. Es gilt somit als schwierig eine fehlerfreie Adsorption der PM-Monoschichten zu gewährleisten.

Als Alternative zu den LPKF-Oberflächen wurden kommerziell erhältliche Goldsubstrate und Template-stripped-Gold Substrate (TSG-Substrate), aus eigener Herstellung, evaluiert. Eine Untersuchung der 1,1,1-Goldoberfläche auf Glimmer zeigt, dass auf atomarem Level diese Probe nicht als glatt bezeichnet werden kann. Es handelt sich hierbei um eine Oberfläche, die sich aus 1,1,1-Goldclustern zusammensetzt. Sie ist nur bedingt für die Adsorption von PM an Gold geeignet. Die TSG-Oberflächen auf Floatglas zeigen etwa um den Faktor 7 niedrigere Rauheitswerte im Vergleich zu den glättesten LPKF-Substraten, und sollten somit bestens zur Adsorption von PM an Gold geeignet sein. Die Gold-auf-Silizium-Oberflächen liegen etwa um den Faktor 3 unter den Rauheitswerte zu den glättesten LPKF-Substraten, und sollten somit zur Adsorption von PM an Gold geeignet sein.

Für die folgenden Abscheidungsversuche von PM auf Goldoberflächen wurden LPKF-Substrate vom Typ 4a, die TSG-Substrate und die Gold-auf-Silizium-Substrate ausgewählt.

Sie zeigen die geringste Rauheit und sollten damit eine weitgehend fehlerfreie Abscheidung gewährleisten. Im Verlauf der Abscheidungsversuche zeigte sich allerdings, dass die im Verhältnis wesentlich raueren LPKF Substrate ungeeignet sind (siehe Kapitel 6.2.4).

6.2.4 Verbindungsaufbau

6.2.4.1 Methoden des Verbindungsaufbaus

Wie bereits eingangs erwähnt, ist die seitenspezifische Anbindung des Biomaterials Purpurmembraan mittels Thiol-Gold-Bindung auf ultraglaten Goldoberflächen Ziel der Untersuchungen. Für die Experimente wurde die molekulargenetisch-modifizierte Mutante D36C ausgewählt. Die durch Punktmutation eingeführte Aminosäure Cystein befindet sich sterisch zugänglich in einem transmembranen Loop auf der cytoplasmatischen Seite der Purpurmembraan. Die Anbindung an die Goldoberfläche sollte somit seitenspezifisch mit der cytoplasmatischen Seite über die Thiol-Funktion der Cysteingruppe erfolgen.

Die chemische Reaktion erfolgt beim Kontakt der Thiolgruppe des BR-Moleküls mit der Goldoberfläche. Hierbei spaltet das Thioldmolekül das Wasserstoffatom ab und bildet ein Gold-Thiolat.

Zur Anbindung von D36C auf Gold wurden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt:

6.2.4.1.1 Diffusionskontrollierte Sedimentation

Bei der diffusionskontrollierten Sedimentation wird die zu beschichtende Goldoberfläche mit einer auf ihr stehenden PM-Suspension unter leichtem Schütteln inkubiert. Hierzu wurde ein HPLC-Vial, das die PM-Suspension enthielt, mit einer Dichtung versehen und in einer Einspannvorrichtung auf das Goldsubstrat gedrückt. Das assemblierte System wurde kopfüber, so dass die Suspension über der Goldfläche stand, auf einen Laborschüttler gestellt. Nach Beendigung der Sedimentation wurde die Goldoberfläche mit Wasser gewaschen und im Argonstrom getrocknet.

Die hierbei zu verwendende Konzentration der PM Suspension ergibt sich entsprechend aus dem verwendeten physikalischen Modell für den Abscheidungsvorgang:

1. PM wird als Festkörper betrachtet, der beim elastischen Stoss mit dem Substrat die durch die um die Membran bestehende Hydrathülle gebildete Barriere durchbricht und dabei abreagiert und so verankert werden kann. Dem folgend wird unter diffusionskontrollierten Bedingungen über eine lange Zeit (mindestens über Nacht) inkubiert und die Konzentrationen der PM so eingestellt, dass die Menge der in der Inkubationslösung angebotenen PM absolut der für eine 1x bis fünffach Bedeckung der inkubierten Gold-Oberfläche ausreicht ^[47].
2. PM wird im Überschuss angeboten, um in überschaubaren Reaktionszeiten zu reproduzierbaren Belegungen zu kommen. Mögliche Mehrfachlagen PM müssten hierbei durch Behandlung der Probe mit Ultraschall oder einer geeigneten Waschlösung entfernt werden. Hier wurden Reaktionszeiten von 1 h bis zu 24 h untersucht.

6.2.4.1.2 Elektrophoretische Sedimentation

Bei der elektrophoretischen Sedimentation wird an die zu beschichtende Goldoberfläche ein Potential gelegt und die PM in der angrenzenden Suspension elektrophoretisch an der Goldoberfläche sedimentiert.

Die beiden wichtigsten Einflussgrößen für die elektrophoretische Abscheidung sind die Ladung und das Dipolmoment der PM. Beide Größen sind eine Funktion von verschiedenen Faktoren, wobei besonders der pH-Wert und die Ionenstärke der Suspension von entscheidender Bedeutung sind. Durch Betrachtung der Verteilung von (de-)protonierbaren Aminosäureresten im BR-Molekül lässt sich bei pH 7 pro Molekül eine Ladung von $7e^-$ Elementarladungen für die extrazelluläre und $12e^-$ für die cytoplasmatische Seite der PM errechnen ^[47, 99]. Das BR-Molekül weist somit bei neutralem pH-Wert eine negative Überschussladung auf. Vor allem aus dem Ladungsungleichgewicht ergibt sich weiterhin ein permanentes Dipolmoment, das von der cytoplasmatischen Seite (Minuspol) zur extrazellulären Seite (Pluspol) gerichtet ist. Das permanente Dipolmoment von PM wurde bei pH 7 zu 140 D pro BR-Molekül durch Messungen des Lineardichroismus in einem niederfrequenten Wechselfeld bestimmt ^[165]. Durch photoelektrische Messungen im elektrischen Feld wurde bei pH 6.6 ein maximales Dipolmoment von 60 D pro BR-Molekül gefunden. Bei pH 5 wurde kein Dipolmoment gemessen und bei niedrigeren pH-Werten ergab sich eine Richtungsumkehr des Dipolmoments ^[166].

Das permanente Dipolmoment und die negative Überschussladung der PM kann zur Orientierung von PM-Fragmenten im elektrischen Feld und/oder zur gerichteten Adsorption an geladenen Oberflächen genutzt werden. Hierbei führen stationäre elektrische Felder bzw. niederfrequente Wechselfelder ($f < 10$ Hz) zu einer vektoriellen Orientierung der PM-Fragmente. Wechselfelder mit Frequenzen $f > 100$ Hz hingegen bewirken keine vektorielle Orientierung, sondern eine Ausrichtung der PM-Fragmente parallel zum Feld. Hier dominiert das durch die Wechselwirkung mit dem Feld induzierte Dipolmoment, das parallel zur Membranoberfläche verläuft ^[165, 166]. Weiterhin führt das angelegte stationäre Feld aufgrund der negativen Überschussladung des BR zu einer Wanderung der PM-Fragmente in Richtung Anode.

Wird die vektorielle Orientierung der PM-Fragmente nicht fixiert, relaxiert sie nach Abschalten des elektrischen Feldes durch Diffusion innerhalb von wenigen Sekunden. Eine Fixierung der Orientierung kann z.B. durch elektrostatische Wechselwirkungen oder durch Unterbindung der Diffusion durch Ausbildung einer festen Matrix, z.B. durch Polymerisation, Gelbildung oder Trocknung, erfolgen. In auspolymerisierten Polyacrylamidgelen konnten aufgrund der fixierten Vorzugsorientierung ein gerichteter photoelektrischer Effekt durch Messung von stationären Photoströmen von $20 \mu\text{Acm}^{-2}$ (Voltage-Clamp-Messungen) bzw. 15nAcm^{-2} (klassische Messung) nachgewiesen werden ^[167-172]. Erfolgt die Fixierung bei angelegtem Feld durch Trocknung der Filme, werden Multilayer-Filme mit Vorzugsorientierung erhalten, die Photospannungen bis zu einigen Volt liefern ^[173-176]. Durch elektrostatische Fixierung an positiv geladene Oberflächen, z.B. Poly-Lysin beschichtetes Glas, gelang es PM-Fragmente mit bis zu 90%iger Vorzugsorientierung bezogen auf die cytoplasmatische Seite zu adsorbieren ^[177].

Für die Mutante D36C ergibt sich aus analogen Überlegungen, dass sich die PM-Fragmente im Fall der elektrophoretischen Abscheidung an der Anode mit der cytoplasmatischen Seite - Seite der Cysteinfunktionalisierung - in Richtung der Anodenoberfläche ablagert. In situ kann dann die Fixierung der PM-Fragmente mittels Thiol-Gold-Brücke erfolgen.

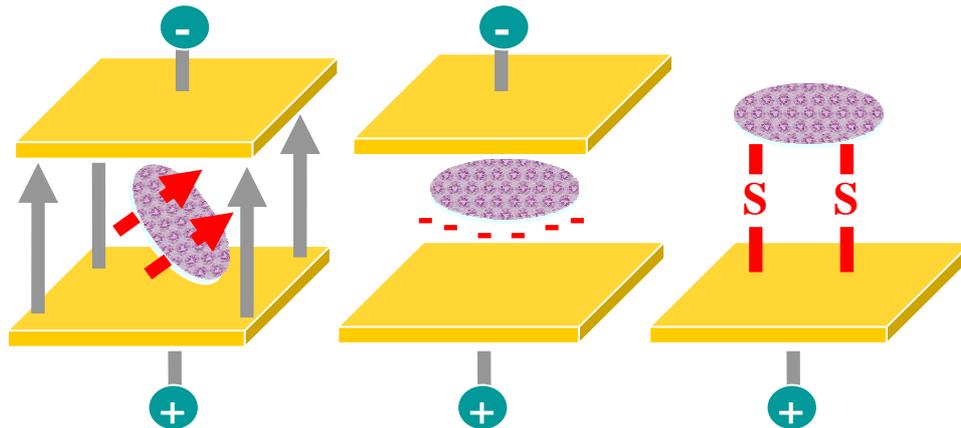


Abb. 103: Schematische Darstellung der elektrophoretischen Sedimentation von D36C. Links: 1. Der Purpurmembranpatch richtet sich entsprechend des E-Feldes aus. Mitte: 2. Der Patch wandert im elektrischen Feld zur Anode. Rechts: 3. Der Patch bindet über Schwefelbrücken an die Goldoberfläche.

In Untersuchungen zum Redoxpotential von PM an mittels elektrophoretischer Sedimentation hergestellten Filmen zeigte sich, dass BR zwei Redoxpotentiale von -0.48 V und -0.76 V aufweist^[178]. Es ergab sich weiterhin, dass Redoxprozesse im Film bis zu einer Schichtdicke von 36 PM-Lagen auftreten. Bereits bei einem Potential von 0.5 V gegenüber SCE (gesättigte Kalomelektrode) tritt eine Oxidation der BR-Moleküle ein. Diese Oxidation ist mit einem hypsochromen Shift des Absorptionsmaximums verbunden. In den ausgeführten Experimenten sollte das an die Anode angelegte Potential 0.4 V nicht überschreiten. Um bei diesem geringen Potential noch ausreichend hohe Feldstärken zu gewährleisten, wurde der Elektrodenabstand mit 1 mm ausreichend gering gewählt. Da bei diesem geringen Elektrodenabstand das Einbringen einer SCE Referenzelektrode nicht möglich ist, wurde statt einer genauen Messung des Potentials der Anode eine Potentialdifferenz von 0.4 V zwischen Anode und Kathode eingestellt.

Vor der elektrophoretischen Sedimentation wurden die Goldoberflächen über eine leitende Verbindung mit Leit-C (Neubauer Chemikalien, Münster) mit Kupferdrähten kontaktiert. Die Elektroden mit einer nach oben geöffneten 1 mm starken Dichtung wurden in einer Einspannvorrichtung aneinander gedrückt. Um eine Sedimentation der PM auf den Goldoberflächen durch Gravitation zu verhindern, wurden die Elektroden senkrecht zum Gravitationsfeld der Erde gestellt. Die Suspension wurde dann durch die Öffnung der Dichtung in die Zelle eingeführt. Vor Anlegen der Gleichspannung von $U = 0.4\text{ V}$ mittels eines stabilisierten Spannungsgenerators vom Typ HM 8001 (HAMEG, Frankfurt) wurde durch Widerstandsmessung ein Kurzschluss in der assemblierten Zelle ausgeschlossen.

Während der elektrophoretischen Sedimentation wurden die Spannung und der Strom mittels Multimeter vom Typ PeakTech 1040 (Heinz-Günter Lau, Ahrensburg) kontrolliert. Nach Beendigung der Sedimentation wurden die Goldoberflächen mit Wasser gewaschen und im Argonstrom getrocknet.

6.2.4.2 Evaluierung des Verbindungsaufbaus

Die Proben aus den Sedimentationsversuchen wurden mittels AFM-Untersuchungen bezüglich ihres Belegungsgrades charakterisiert.

6.2.4.2.1 Sedimentation von PM auf LPKF-Oberflächen

Zunächst wurden sowohl zahlreiche Untersuchungen zur diffusionskontrollierten als auch elektrophoretischen Sedimentation von PM auf LPKF-Substraten unter verschiedensten Versuchsbedingungen durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass die Oberflächen nicht bzw. nur sehr mangelhaft mittels dieser Methoden zu belegen sind oder die Belegung aufgrund der hohen Oberflächenrauheit der Substrate nicht bzw. nur sehr schwer nachweisbar ist (siehe Abb. 104).

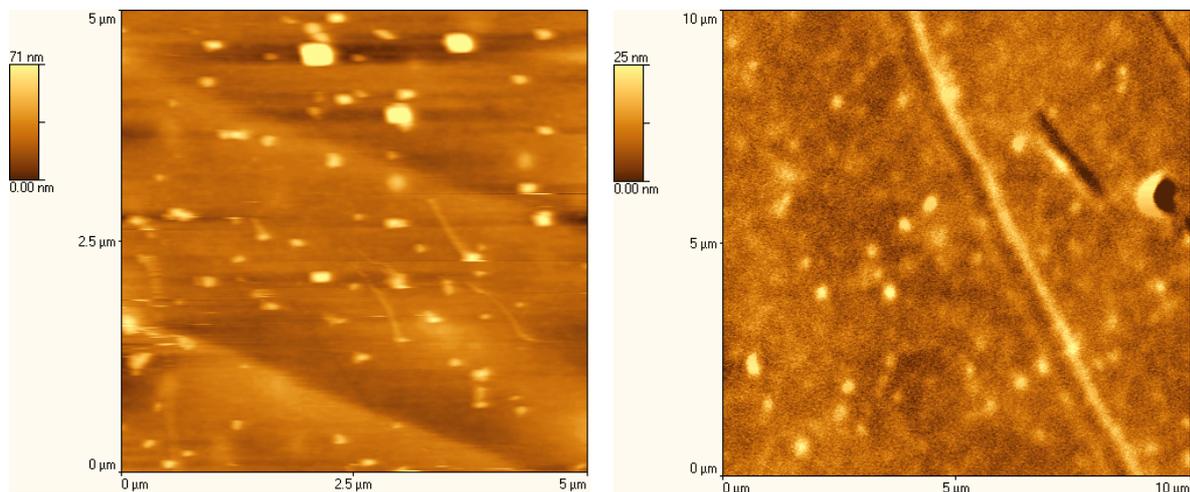


Abb. 104: AFM Aufnahmen nach der diffusionskontrollierten Sedimentation von D36C auf Au-LPKF-Substraten vom Typ 4a. pH 2.0 entspricht isoelektrischer Punkt PM, Inkubation für 24 h ^[47]. Links: Ansatzmenge entspricht Monolage PM. Rechts: Ansatzmenge wesentlich größer als Monolage PM, OD 0.9 pH.

6.2.4.2.2 Sedimentation von PM auf TSG- und Gold-Silizium-Oberflächen

Für weitere Versuche wurden im Folgenden TSG- und Gold-Silizium-Substrate verwendet. Zunächst wurden pufferfreie Inkubationslösungen mit PM Konzentrationen eingesetzt, die absolut für eine einfach bis fünffach Bedeckung der Gold-Oberfläche ausreichen^[47].

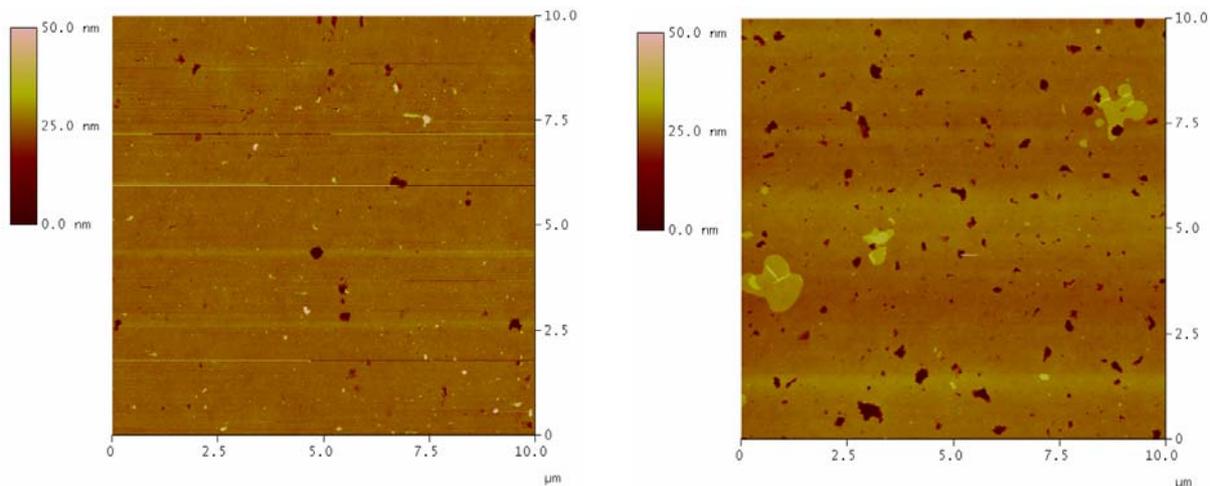


Abb. 105: AFM Aufnahmen nach der diffusionskontrollierten Sedimentation von PM auf TSG-Substraten. Ansatzmenge entspricht Monolage PM, kein Puffer, Inkubation für 24 h^[47]. Links: Probe D36C. Rechts: Kontrolle D96N.

Hierbei zeigte sich, dass nur sehr wenig D36C, als auch D96N, auf den Substraten sedimentiert (siehe Abb. 105). Alle Untersuchungen zur diffusionskontrollierten Sedimentation von PM an Gold in Abwesenheit eines Puffers führten trotz Variation der OD, des Substrats und der Inkubationszeit, nur zu einer sehr mangelhaften Belegung der Oberfläche. Neben den Versuchen mit pufferfreien Suspensionen wurden auch verschiedene Versuche mit höheren PM Konzentrationen in verschiedenen Puffersystemen durchgeführt.

Die Versuche mit Puffer führen immer zu einer dichten Belegung der Oberfläche sowohl mit D36C, als auch mit D96N. Beide PM Typen sind nicht durch Waschen mit Wasser von der Oberfläche zu entfernen. Eine Behandlung der Gold-Silizium-Proben im Ultraschallbad führt zu einer fast vollständigen Entfernung des D36C und des D96N. Somit ist von einer rein physikalischen Adsorption der PM an die Goldoberfläche auszugehen: Diese Form der Adsorption beruht weitgehend auf elektrostatische Wechselwirkung, die durch Zusatz von Ionen stark zunimmt. Dies zeigt sich besonders deutlich im Vergleich der Experimente mit und ohne Puffer (siehe Abb. 105 & Abb. 106). Zusammenfassend ist eine diffusionskontrollierte Sedimentation nicht zur chemischen Adsorption von D36C an Gold geeignet.

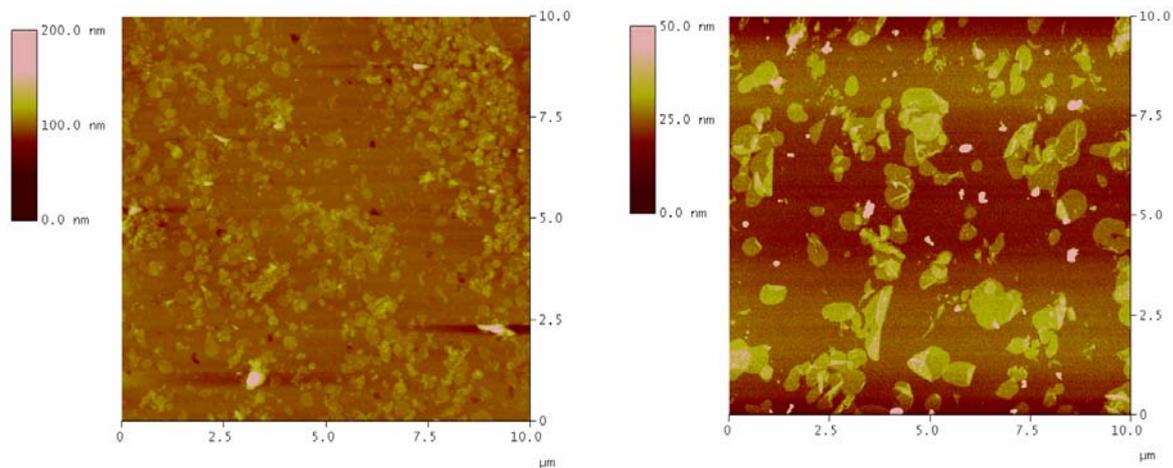


Abb. 106: AFM Aufnahmen nach der diffusionskontrollierten Sedimentation von PM auf Au-Substraten. Ansatzmenge wesentlich größer als Monolage PM, OD 1.0, pH 7.2, Inkubation für 24 h. Links: Probe D36C auf TSG-Substrat. Rechts: Kontrolle D96N auf Au-Si-Substrat.

In Versuchen zur elektrophoretischen Sedimentation von D36C auf TSG-Gold konnte gezeigt werden, dass diese Methode zu einer weitgehend dichten, monolagigen Belegung der Anode mit D36C führt. Die Methode erfolgte pufferfrei, es kann somit eine Beeinflussung der Belegung durch die Anwesenheit von Ionen ausgeschlossen werden. Kontrollproben mit D96N zeigten fast keine Belegung der Oberfläche mit PM. Eine Behandlung dieser Gold-Silizium-Proben im Ultraschallbad führt nur zu einer Entfernung des D96N, D36C bleibt weiterhin an der Oberfläche adsorbiert (siehe Abb. 107). Beide Ergebnisse konnten mehrfach reproduziert werden. Es existiert somit eine Methode mit der gezielt nur D36C auf die Goldoberfläche adsorbiert werden kann. Da D96N Kontrollproben unter gleichen Versuchsbedingungen fast kein Bestreben zeigen an die Oberfläche zu adsorbieren, ist von einer chemischen Bindung des D36C an die anodische Oberfläche auszugehen. Diese Aussage wird weiterhin durch die Ergebnisse aus den Versuchen zur diffusionskontrollierten Sedimentation gestützt. Im Vergleich zu den D36C Proben die mittels elektrophoretischer Sedimentation hergestellt wurden, lassen sich die mittels diffusionskontrollierter Sedimentation nur physikalisch adsorbierten PM-Fragmente fast vollständig im Ultraschallbad entfernen. Ausgehend von den Ergebnissen von Stoeckenius et al ^[177], die feststellten, dass bei neutralem pH die PM vorzugsweise mit bis zu 90 % mit der CP-Seite an positiv geladene Oberflächen adsorbiert, kann bei den hier unter ähnlichen Bedingungen erzeugten Assemblies auf eine ebenso hohe Vorzugsorientierung geschlossen werden.

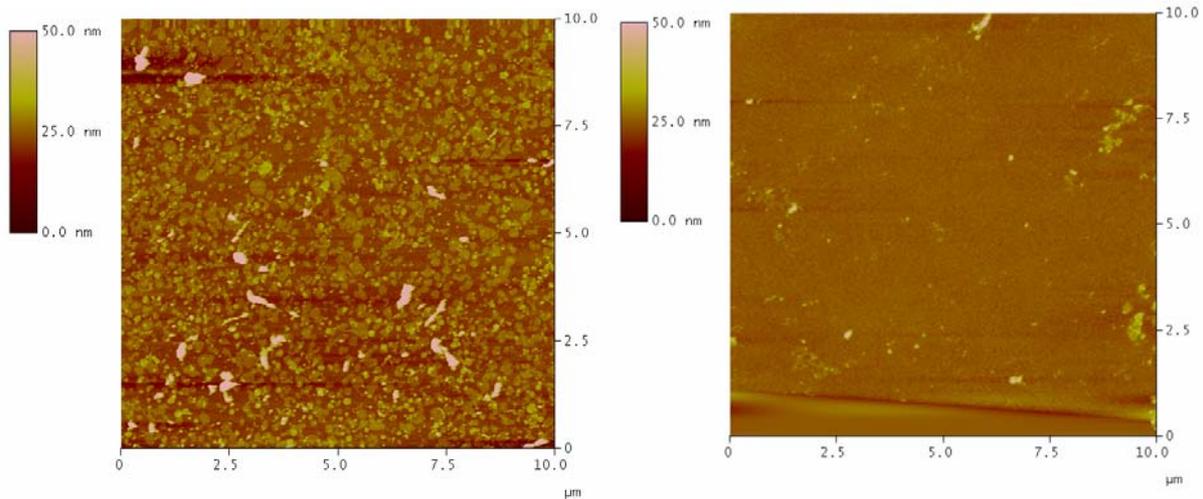


Abb. 107: AFM Aufnahmen nach der elektrophoretischen Sedimentation von PM auf Au-Si-Substraten. Ansatzmenge wesentlich größer als Monolage PM, OD 10, kein Puffer, Inkubation für 60 min bei 400 mV und 1 mm Elektrodenabstand. Links: Probe D36C nach US-Bad. Rechts: Kontrolle D96N nach US-Bad.

Abschließend soll angemerkt werden, dass die Methioningruppen von PM bei Kontakt mit einer Goldoberfläche dissoziieren und als Mercaptomethanol an die Goldoberfläche binden können ^[179]. Dieser zu einer Passivierung der Oberfläche führende Vorgang scheint allerdings nach den hier gewonnenen Versuchsergebnissen keinen limitierenden Faktor in der Belegung von Goldoberflächen mit PM darzustellen.

6.2.5 Zusammenfassung

Im Rahmen der durchgeführten Experimente konnte mit der elektrophoretischen Sedimentation die Grundlagen zur seitenspezifischen Fixierung von PM-Fragmenten vom Typ D36C auf Goldsubstraten etabliert werden. Die Adsorption erfolgt spezifisch für D36C - physikalisch adsorbierte PM kann mittels Reinigungsschritt im Ultraschallbad entfernt werden. Die mittels der entwickelten Methode auf Gold erzeugte PM-Schicht zeigt einen hohen Belegungsgrad und ist weitgehend monolagig. Unter Nutzung des Phänomens der Selbstorganisation wurden in der vorliegenden Arbeit Grundlagen für neue Montagetechniken zur Positionierung und Fixierung von Mikro- und Nanokomponenten erarbeitet.

6.3 BR in Hybrid-Bio-Systemen

6.3.1 Einleitung

An der Philipps-Universität Marburg findet der Aufbau eines DFG geförderten Forschungsverbundes und anwendungsorientierten Kompetenzzentrums auf dem Gebiet der Synthese von neuen Materialien, die sowohl chemische wie auch biologische Komponenten enthalten, statt. In diesem Zusammenhang befasst sich die Arbeitsgruppe um Prof. Hampp mit der Synthese von Hybrid-Bio-Systemen, die durch Kombination von Purpurchromophoren mit verschiedenen Biosystemen erzeugt werden. In der vorliegenden Arbeit sollen die Grundlagen der Kopplungschemie an BR untersucht werden und ein allgemeingültiges Konzept zur Anbindung von biologischen Nanobausteinen, wie z.B. Enzymen, an das Templat PM erarbeitet werden.

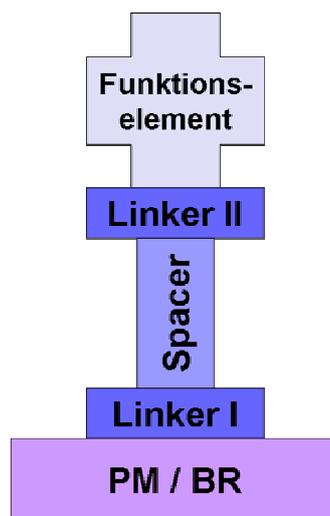


Abb. 108: Schematische Darstellung der Kopplungsmethode zum Aufbau von Hybrid-Bio-Systemen an PM.

Die Anbindung der nanoskaligen Funktionseinheiten an der PM soll über ein bifunktionelles Linkersystem erfolgen (siehe Abb. 108). Im Folgenden sind geeignete funktionelle Einheiten zur Anbindung auszuwählen, wobei hier zwischen zwei unterschiedlichen Bindungsstellen unterschieden werden muss:

- ◆ Linker I - Bindung zwischen PM/BR und bifunktionellem Linkersystem
- ◆ Linker II - Bindung zwischen bifunktionellem Linkersystem und Funktionselement

6.3.2 Etablierung der massenspektrometrischen Analyse von BR

Die Vorbedingung für die Entwicklung von Kopplungsmethoden ist die Verfügbarkeit geeigneter Analysemethoden. Vor allem Methoden zur Bestimmung von Reaktionsausbeuten der chemischen Modifikationen und Verfahren zur Lokalisierung von biochemischen Modifikationen sind hier zu etablieren.

Im Vergleich zur etablierten Massenspektrometrie von Proteinen, ist die Messung von integralen Membranproteinen oder transmembranen Proteinen schwierig. Aufgrund der schlechten Lösungseigenschaften der Membranproteine bedarf es spezieller Gemische, um das Protein für die ESI-MS Probenvorbereitung zu solubilisieren. Im Allgemeinen werden in den Gemischen entweder hohe Konzentrationen an Ameisensäure bzw. Trifluoressigsäure (TFA) oder Detergenzien eingesetzt. Gemische mit hohen Säurekonzentrationen können aufgrund der hohen Korrosionsneigung nur bei entsprechender Gerätekompatibilität verwendet werden. Detergenzien hingegen führen oft zu einer starken Unterdrückung der Ionenbildung in der ESI-MS.

Zur Messung des Apoproteins Bakterioropsin (BO) wurden einige Arbeiten publiziert [180-184]. Im Vergleich zeigt die Verwendung eines Lösungsmittelgemisches aus Chloroform/Methanol/Wasser (CMW) das beste Signal/Rauschverhältnis und mit 0.01 % die geringste Abweichung in der Massenbestimmung [184]. Ausgehend von diesem Lösungsmittelgemisch wurde eine Methode in der AG Prof. Hampp etabliert (siehe Kapitel 3.6.4.1). Hierbei zeigte sich das die Homogenisierungsschritte mittels Ultraschallsonde essentiell für eine reproduzierbare Probenvorbereitung sind, andernfalls schwankt das Signal/Rauschverhältnis stark.

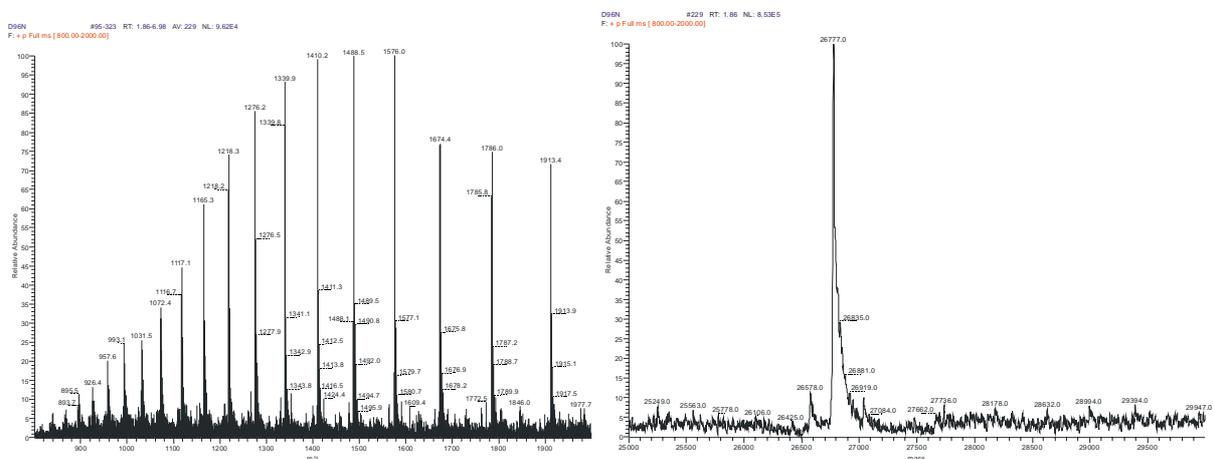


Abb. 109: MS-Messung von D96N auf LCQDuo (Thermo, Dreieich). Links: Gemessenes Spektrum. Rechts: Spektrum nach der Dekonvolution (siehe Kapitel 3.6.4.1) [71, 72].

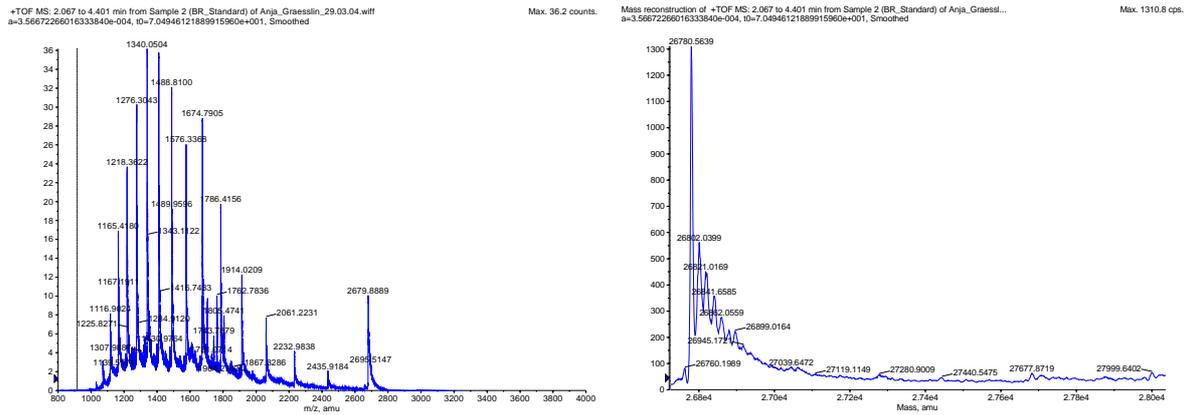


Abb. 110: MS-Messung von D96N auf QStar Pulsar (Applied Biosystems, Darmstadt). Links: Gemessenes Spektrum. Rechts: Spektrum nach der Dekonvolution (siehe Kapitel 3.6.4.1) [71, 72].

In Abb. 109 und Abb. 110 sind vergleichend Messungen von D96N BO auf unterschiedlichen ESI-Massenspektrometern dargestellt. Im Vergleich zur Ionenfalle des LCQDuo verfügt der TOF-Analysator des QStar Pulsar über eine höhere Auflösung und ein besseres Signal/Rausch-Verhältnis. Im Verlauf der Untersuchungen wurden die Messungen am LCQDuo ausgeführt, im Fall von komplexen Reaktionsprodukten wurde das QStar Pulsar verwendet.

Zur Lokalisierung der Bindungsstellen im BR nach biochemischer Modifikation wurde im Folgenden eine Methode basierend auf einer Fragmentierung des Proteins mit anschließender LC/MS/(MS) Messung entwickelt. Die Fragmentierung kann mittels Enzymen, wie z.B. Chymotrypsin oder chemisch mit z.B. Bromcyan erfolgen. Im Fall von BR kann die enzymatische Fragmentierung nur in Anwesenheit von Detergenzien durchgeführt werden, da sonst das Protein nicht solubilisiert vorliegt und damit der Abbau durch das Enzym gehemmt wird. Allerdings besteht in Anwesenheit von Detergenzien auch die Gefahr einer Entfaltung und damit Deaktivierung des Enzyms. Weiterhin führen die Detergenzien, wie bereits eingangs erwähnt, oft zu einer starken Unterdrückung der Ionenbildung in der ESI-MS und stören zusammen mit dem Enzym in der Messung als weitere Verunreinigung. Zur Messung von fragmentierten Opsinen, u.a. Bakterioropsin, wurden einige Arbeiten publiziert [185-188].

Ausgehend von veröffentlichten Vorschriften zum BrCN-Verdau von BO wurde eine Methode zur LC/MS/(MS) Sequenzierung entwickelt (siehe Kapitel 3.6.4.2) [186, 189].

Die chemische Spaltung mittels BrCN erfolgt nahezu quantitativ auf der C-terminalen Seite von Methionin. Schlechte Spaltungsausbeuten treten nur bei den Aminosäuresequenzen Methionin-Threonin und Methionin-Serin auf^[67]. Nach der Spaltung liegt das Methionin als Homoserin-Lacton vor, das teilweise zu Homoserin isomerisiert (siehe Abb. 111).

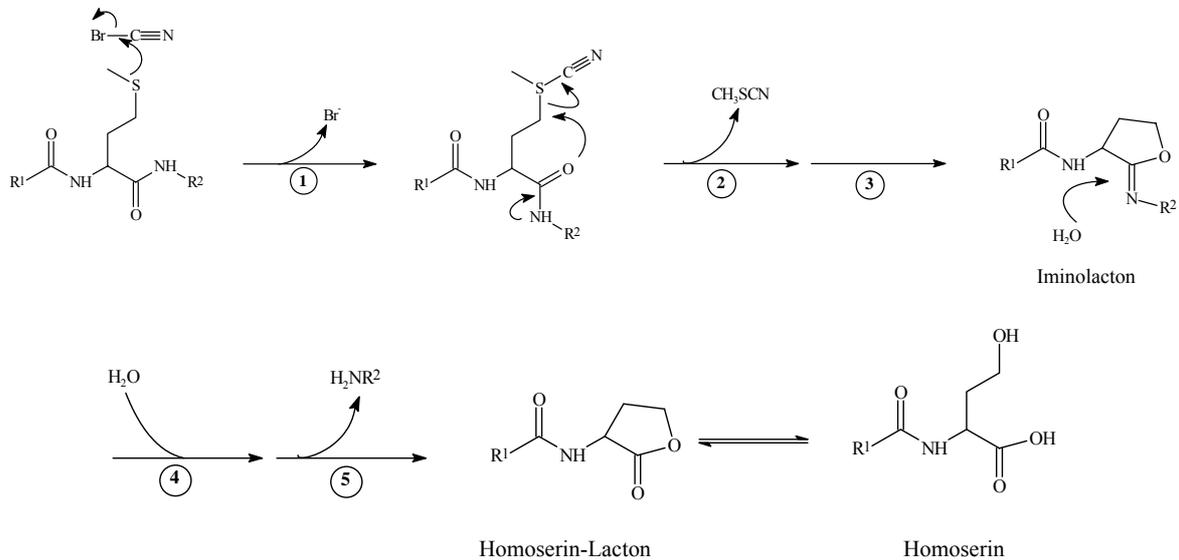


Abb. 111: Reaktionsabfolge der chemischen Fragmentierung durch BrCN^[49, 67]. 1. elektrophiler Angriff von BrCN an der Methioninseitenkette unter Bildung eines Sulfoniumions. 2. Freisetzung von Methylthiocyanat 3. Bildung eines intermediären Iminolactons. 4. Hydrolyse zum Homoserinlacton 5. Freisetzung eines Amins.

Bezogen auf die Aminosäuresequenz von BO ergeben sich neun Spaltstellen für eine Bromcyan-Spaltung und dementsprechend 10 Fragmente (siehe Abb. 112).

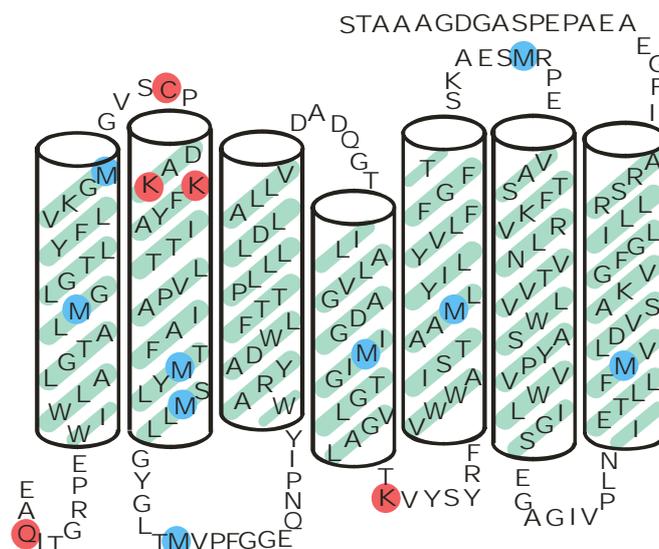


Abb. 112: Darstellung der Aminosäuresequenz von D36C^[190]. Die transmembranen Helices werden durch Zylinder symbolisiert. Die Methionin-Spaltstellen sind blau und die Bindungsstellen für eine biochemische Modifikation rot gekennzeichnet.

Die Massen der Fragmente wurden mittels Protein-Prospector MS-Product 4.05 (prospector.ucsf.edu) ^[75] berechnet (siehe Tab. 32). Hierbei ist zu beachten, dass das N-terminale Glutamat E1 in BR als Pyroglutaminat ^[189] vorliegt und dass das bei der Fragmentierung gebildete Homoserinlacton im Gleichgewicht mit Homoserin vorliegt (siehe Abb. 112).

Tab. 32: Monoisotopische (mi) und durchschnittliche (av) MH⁺-Masse der Fragmente einer Bromcyan-Spaltung von WT BR (E1 = Pyroglutaminat, Homoserinlacton, N-Terminus = Wasserstoff, C-Terminus = freie Säure)

Masse (mi) / Da	Masse (av) / Da	Position	Aminosäuresequenz	Nr
2191.18	2192.56	1 – 20	EAQITGRPEWIWLALGTALM	1
1250.71	1251.52	21 – 32	GLGTLYFLVKGM	2
2508.34	2509.92	33 – 56	GVSDPDAKKFYAITTLVPAIAFTM	3
465.23	465.53	57 – 60	YLSM	4
819.46	819.98	61 – 68	LLGYGLTM	5
5397.85	5401.26	69 – 118	VPPFGGEQNPIYWARYANWLFTTP LLLLDLALLVDADEGTILALVGA DGIM	6
2913.57	2915.43	119 – 145	IGTGLVGALTKVYSYRFVWWAIS TAAM	7
2081.10	2082.46	146 – 163	LYILYVLFFGFTSKAESM	8
5036.80	5040.00	164 – 209	RPEVASTFKVLRNVTVVLWSAY PVVWLVIGSEGAGIVPLNIETLLFM	9
3843.03	3845.37	210 – 248	VLDVSAKVGFLILLRSRAI FGAEAEPEPSAGDGAAATS	10

Zur Identifizierung der Fragmente im Totalioncount-Chromatogramm (TIC) wurden in der Software Qual Browser 1.3 (Thermo, Dreieich) entsprechende Massenfilter verwendet (siehe Abb. 113). Nach Filterung hob sich das entsprechende Fragment deutlich als Peak vom Untergrund ab, wobei sich zeigte, dass die Fragmente 1 und 8 je nach Messung teilweise schwer zu identifizieren sind. Die jeweiligen Fragmente wurden als eindeutig zugeordnet angesehen, wenn die MS/MS-Spektren mit den mittels Protein-Prospector MS-Product 4.05 (prospector.ucsf.edu) ^[75] simulierten Fragmente des CID eine gute Übereinstimmung zeigten (siehe Kapitel 3.6.4.2).

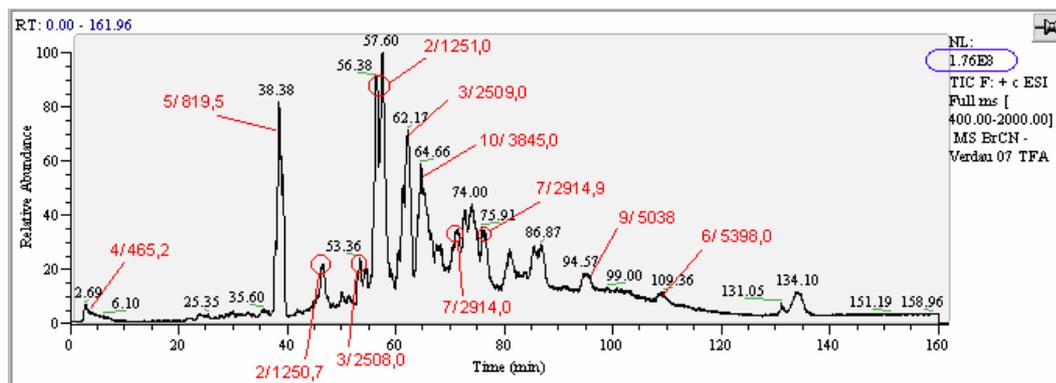


Abb. 113: MS-Chromatogramm mit zugeordneten Fragmenten einer Bromcyan-Spaltung von WT BR.

Im Folgenden wurde untersucht in welcher Form das während der Fragmentierung gebildete Homoserinlacton bevorzugt vorliegt (siehe Tab. 33). Für fast alle Fragmente gilt, dass die relative Intensität des Ioncounts für das Homoserinlacton durchschnittlich um eine Größenordnung höher ist als für das Homoserin. Weiterhin bestätigt die Messung auch, dass nach der Fragmentierung N-Terminale bevorzugt ein Pyroglutaminat vorliegt. Im Allgemeinen zeigen die Fragmente mit der geringsten Ladungszahl, in der Tabelle rot hervorgehoben, das stärkste Massensignal.

Tab. 33: Relative Intensität des Ioncounts für die Fragmente einer Bromcyan-Spaltung von WT BR. (Homoserinlacton (HSL), Homoserin (HS) Glutamat (E) Pyroglutamat (PE)).

Fragment	rel. Intensität (HSL- PE)	rel. Intensität (HSL - E)	rel. Intensität (HS - E)
1 (MH ₂ ²⁺)	4.38 · 10⁷	9.75 · 10 ⁶	1.51 · 10 ⁶
1 (MH ₃ ³⁺)	6.04 · 10⁶	8.74 · 10 ⁵	1.02 · 10 ⁶
2 (MH ⁺)		4.80 · 10⁸	1.67 · 10 ⁷
2 (MH ₂ ²⁺)		2.39 · 10⁸	2.48 · 10 ⁷
3 (MH ₂ ²⁺)		1.22 · 10⁸	2.19 · 10 ⁷
3 (MH ₃ ³⁺)		5.33 · 10⁷	1.20 · 10 ⁷
4 (MH ⁺)		1.91 · 10⁷	7.08 · 10 ⁵
5 (MH ⁺)		1.07 · 10⁸	5.32 · 10 ⁷
6 (MH ₃ ³⁺)		4.60 · 10⁷	1.34 · 10 ⁷
6 (MH ₄ ⁴⁺)		3.04 · 10 ⁶	5.05 · 10⁶
7 (MH ₂ ²⁺)		1.08 · 10⁸	1.33 · 10 ⁷
7 (MH ₃ ³⁺)		6.82 · 10⁷	1.51 · 10 ⁷
8 (MH ₂ ²⁺)		3.73 · 10⁷	2.52 · 10 ⁶
8 (MH ₃ ³⁺)		2.69 · 10⁶	1.09 · 10 ⁶
9 (MH ₃ ³⁺)		4.62 · 10⁷	8.46 · 10 ⁶
9 (MH ₄ ⁴⁺)		3.37 · 10⁷	2.44 · 10 ⁷
9 (MH ₅ ⁵⁺)		7.08 · 10⁶	3.02 · 10 ⁶
10 (MH ₂ ²⁺)		6.13 · 10⁶	7.63 · 10 ⁵
10 (MH ₃ ³⁺)		3.20 · 10⁷	2.89 · 10 ⁶
10 (MH ₄ ⁴⁺)		1.91 · 10⁷	3.89 · 10 ⁶

6.3.3 Auswahl und Evaluierung des Linker I

Zur Anbindung nanoskaliger Funktionseinheiten an die PM muss zunächst die Kopplung von Linkersystemen an BR etabliert werden (siehe Abb. 108). Hierzu bietet sich klassisch die Konjugatchemie der modernen Biochemie an ^[160, 161, 191, 192]. Im Folgenden wurden reaktive Gruppen verschiedener Linkersysteme auf ihre Bindungsfähigkeit und Selektivität der Bindungsposition untersucht. Eine Einschränkung der möglichen Bindungspositionen ergibt sich bereits aus sterischen Überlegungen. Da die Anbindung des Linkers am BR membranintegriert erfolgt, kann die Kopplung nur an den extramembranen Loops oder Termini erfolgen.

6.3.3.1 Anbindung an primäres Amin

BR verfügt über 7 primäre Aminogruppen - K39, K40, K41, K129, K159, K172 und K216. Die ϵ -Aminogruppen dieser Lysine sind für Kopplung unterschiedlich gut sterisch zugänglich. Die N-terminale Aminofunktion ist in BR aufgrund des gebildeten Pyroglutamins nicht zugänglich ^[189]. Weiterhin ist an die primäre Aminogruppe des Lysin-216 das Retinal gebunden - eine Anbindung ist hier nicht möglich.

6.3.3.1.1 Kopplung mittels N-Hydroxysuccinimidester

Ester des N-Hydroxysuccinimid (NHS) bzw. sulfo-NHS reagieren mit Nukleophilen durch Abspaltung der NHS- bzw. sulfo-NHS-Gruppe unter Bildung eines acylierten Produkts. Reaktionen mit Thiolen und Hydroxygruppen führen hierbei zu keinem stabilen Produkt. Die gebildeten Thioester- oder Esterverbindungen hydrolysieren schnell in wässriger Umgebung. Die Reaktion mit primären und sekundären Aminen führt hingegen zu stabilen Amid- und Imidbindungen (siehe Abb. 114) ^[160].

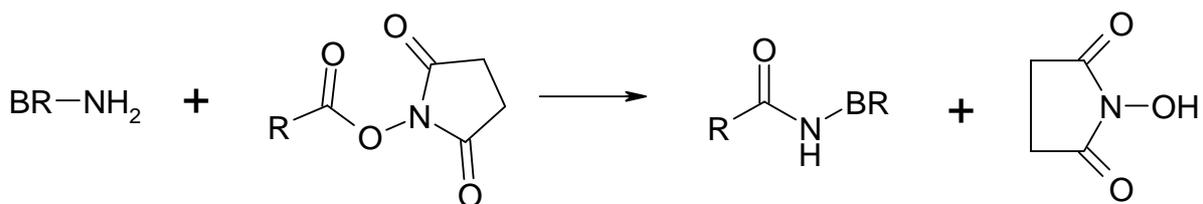


Abb. 114: Reaktionsgleichung für die Kopplung mittels N-Hydroxysuccinimidester.

In der Literatur wird beschrieben, dass die Umsetzung von BR mit 6-(Fluorescein-5-carboxamido)-hexansäure-N-succinimidylester (FLS) zu einem Monoaddukt führt^[47]. Als potentielle Bindungsstelle wird hier Lysin-129 postuliert. Die Verfolgung der Reaktionsausbeute als Funktion des pH Werts des Reaktionsmediums ergab, dass das Optimum bei pH 8.5 liegt und bei sonst für diese Umsetzung üblichen physiologischen pH Werten (pH 7.4) fast keine Reaktion eintritt. Die Anbindung mittels NHS-Ester findet bevorzugt am α -Amin von Aminosäuren statt, also in Proteinen am N-Terminus^[193]. Im Vergleich zur ϵ -Aminofunktion von Lysin, pK_a 9.3-9.5, ist der Säureexponent für das N-terminale Amin mit pK_a 7.6-8.0 wesentlich geringer und eine Reaktion kann schon bei physiologischen pH Werten durchgeführt werden^[160]. Im BR ist keine freie α -Aminofunktion vorhanden, da die n-terminale Aminosäure als Pyroglutaminat vorliegt. Deshalb kann die Umsetzung nur bei höheren pH Werten an der ϵ -Aminofunktion vom Lysin erfolgen. Hierzu ist anzumerken, dass die Hydrolyse der NHS-Ester eine starke Funktion des pH Werts darstellt. So beträgt die Halbwertszeit bei pH 7 / 0 °C typisch 4-5 h^[194], bei pH 8 / 25 °C ca. 1 h^[195] und bei pH 8.6 / 4 °C nur noch 10 min^[160,193]. Somit stellt bei höheren pH Werten die Hydrolyse eine nicht zu vernachlässigende Konkurrenzreaktion zur Anbindung dar.

Beispielhaft für eine Anbindung mittels N-Hydroxysuccinimidester wurde BR mit N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyloxy)-succinimid (Fmoc-OSu) umgesetzt. Hierzu wurden 4.2 mg (160 nmol) D96N in 1600 μ L Boratpuffer (10 mM, pH 8.5) suspendiert. Anschließend wurde die Suspension mit 0.05 mg (160 nmol) Fmoc-Osu in 200 μ L DMSO versetzt und gevortext. Die Suspension wird für 24 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zentrifugation wurde das Pellet dreimal mit Boratpuffer (10 mM, pH 8.5) gewaschen. Danach wurde das Pellet in Boratpuffer (10 mM, pH 8.5) aufgenommen und über Nacht stehen gelassen. Nach Zentrifugation wurde das Pellet dreimal mit KCl-Lösung (100 mM) gewaschen. Zuletzt wurde einmal mit Wasser gewaschen, die Probe erneut in Wasser aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Die massenspektrometrische Analyse (siehe Kapitel 3.6.4.1) des Produkts der Reaktion von Fmoc-OSu mit D96N zeigt deutlich neben dem Peak für D96N bei 26784.0 Da (berechnet 26782.6 Da) den Produktpeak des Fmoc-OSu gelabelten D96N bei 27006.0 Da (berechnet 27004.8 Da) (siehe Abb. 115).

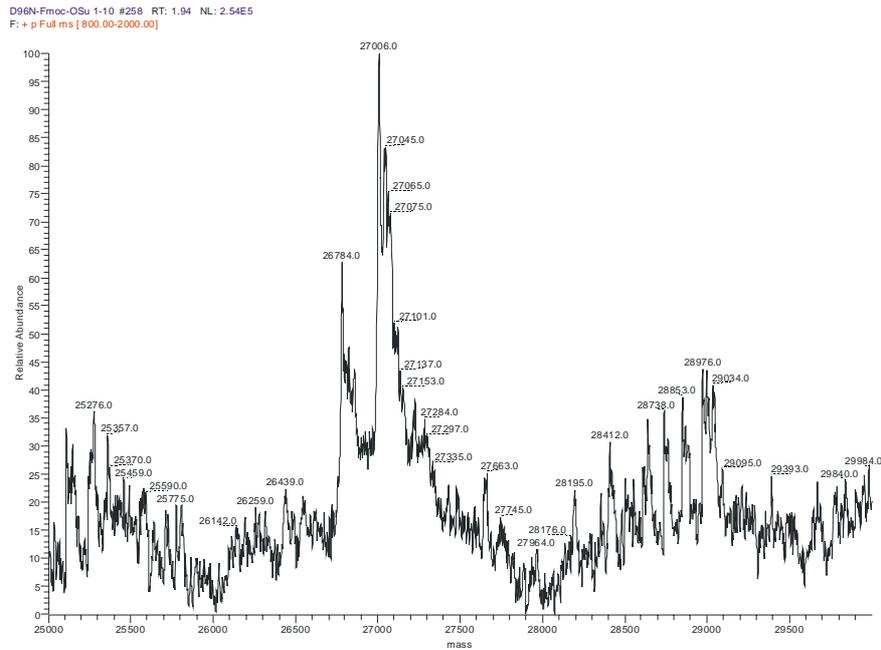


Abb. 115: MS-Messung eines Fmoc-OSu gelabelten D96N.

Zur Identifizierung der Bindungsstelle des Fmoc-OSu-Labels wurde eine BrCN-Spaltung des Produkts durchgeführt und mittels LC/MS/MS untersucht (siehe Kapitel 3.6.4.2). Das Totalioncount-Chromatogramm (TIC) wurde durch Einsatz entsprechende Massenfilter nach gelabelten Fragmenten durchsucht. Bei einer Filterung im Bereich von 1567.3 Da bis 1569.3 Da hebt sich deutlich ein Peak vom Untergrund ab (siehe Abb. 116). Dieser Peak entspricht dem MH_2^{2+} -Ion des Fmoc-OSu gelabelten Fragments 7 (berechnet (mi) MH^+ 3135.6 Da, MH_2^{2+} 1568.3 Da, MH_3^{3+} 1045.8 Da). Da das Fragment 7 aus den Aminosäuren 119 bis 145 besteht, kann auf eine Reaktion des Fmoc-OSu-Labels mit Lysin-129 geschlossen werden.

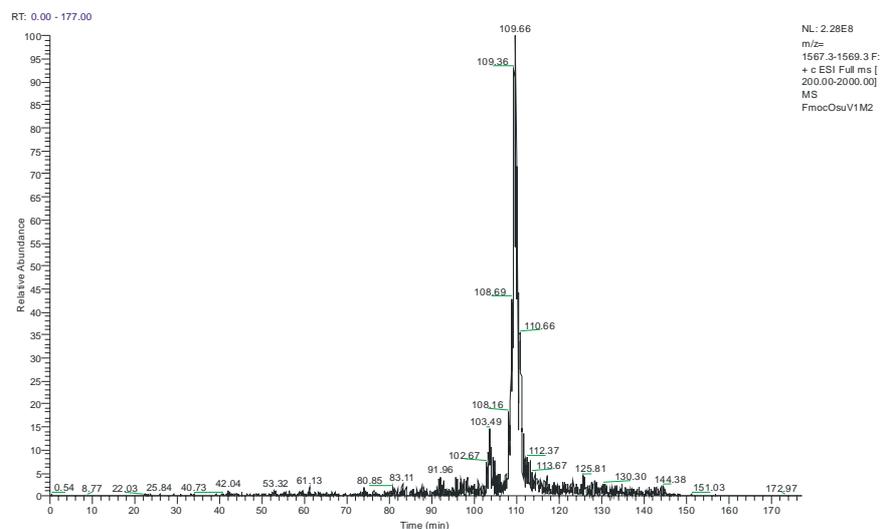


Abb. 116: Massengefiltertes TIC-Chromatogramm eines Fmoc-OSu gelabelten D96N nach Bromcyan-Spaltung (Range 1567.3 - 1569.3 Da).

In Abb. 117 ist das dem TIC-Peak aus Abb. 116 entsprechende gemittelte Massenspektrum dargestellt. Deutlich zeigen sich bei 1569.1 Da der MH_2^{2+} - und bei 1046.0 Da der MH_3^{3+} -Peak des Fmoc-OSu gelabelten Fragments 7 (berechnet (mi) MH^+ 3135.6 Da, MH_2^{2+} 1568.3 Da, MH_3^{3+} 1045.8 Da) im Spektrum. Zur weiteren Verifizierung der Anbindung an Fragment 7 wurden im MS/MS-Spektrum die Fragmente des CID zugeordnet (siehe Anhang 8.2.1).

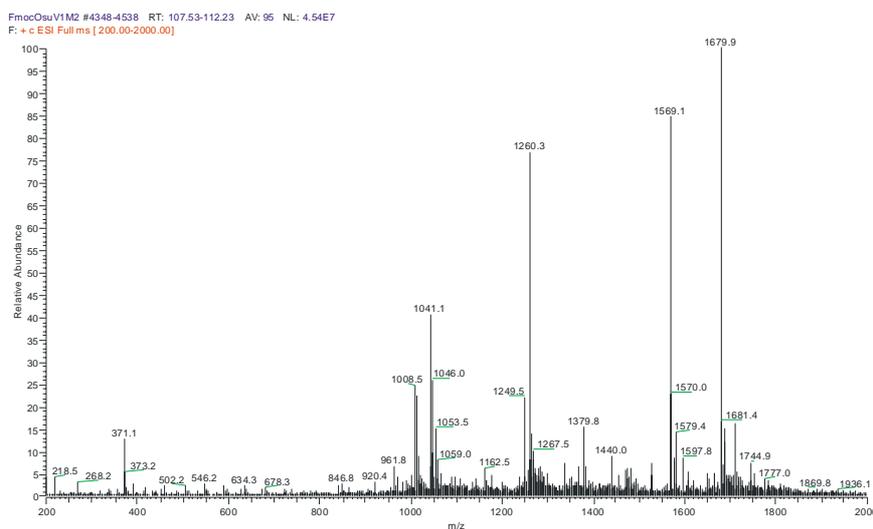


Abb. 117: LC/MS-Messung eines Fmoc-OSu gelabelten D96N nach Bromcyan-Spaltung.

Zusammenfassend konnte durch massenspektrometrische Untersuchungen die erfolgreiche Anbindung von Fmoc-OSu an BR nachgewiesen werden. Als Bindungsstelle des NHS-Esters wurde Lysin-129 durch LC/MS/MS Untersuchungen identifiziert. Dies deckt sich mit der in der Literatur für andere NHS-Ester (1-(3-(Succinimidylloxycarbonyl)benzyl)-4-(5-(4-methoxyphenyl)oxazol-2-yl)pyridiniumbromid (PYMPO) ^[196], 6-(Fluorescein-5-carboxamido)-hexansäure-N-succinimidylester (FLS) ^[47]) postulierten Bindungsstelle K129.

6.3.3.1.2 Kopplung mittels Isothiocyanat

Isothiocyanate (ITC) reagieren mit Nucleophilen, wie Aminen, Thiolen und Phenolationen von Tyrosinseitenketten, wobei nur die Reaktion mit primären Aminen zu einem stabilen Produkt führt. Deshalb gilt ITC als selektiv für die Anbindung an ϵ - und N-terminalen Aminen in Proteinen (siehe Abb. 118) ^[160].

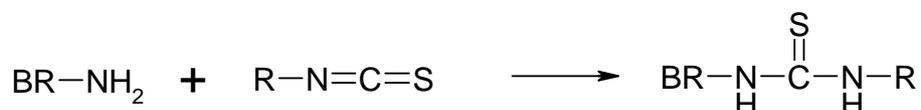


Abb. 118: Reaktionsgleichung für die Kopplung mittels Isothiocyanat.

Anbindungen von Fluorescein-isothiocyanat an BR werden in der Literatur als selektiv für Lysin-129 postuliert ^[197]. Die hydrophoben Isothiocyanate – Phenyl-isothiocyanat, Azidophenylisothiocyanat, Isothiocyanato-naphtalinazid und 4-N-N'-Dimethylamino-azobenzol-4'-isothiocyanat – hingegen selektiv für K40 und K41 ^[198].

Beispielhaft für eine Anbindung mittels Isothiocyanat wurde BR mit 4-(5-Dimethylamino-1-naphtalinsulfonylamino)-phenylisothiocyanat (DNSAPITC) umgesetzt. Eine eingehende Betrachtung der Reaktion von DNSAPITC mit BR findet sich in ^[52]. Hierzu wurden 4.2 mg (160 nmol) D96N in 1600 µL Boratpuffer (10 mM, pH 8.0) suspendiert. Anschließend wurde die Suspension mit 0.6 mg (1600 nmol) DNSAPITC in 200 µL DMSO versetzt und gevortext. Die Suspension wird für 24 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zentrifugation wurde das Pellet dreimal mit Boratpuffer (10 mM, pH 8.0) gewaschen. Danach wurde das Pellet in Boratpuffer (10 mM, pH 8.0) aufgenommen und über Nacht stehen gelassen. Nach Zentrifugation wurde das Pellet dreimal mit KCl-Lösung (100 mM) gewaschen. Zuletzt wurde einmal mit Wasser gewaschen, die Probe erneut in Wasser aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Die massenspektrometrische Analyse (siehe Kapitel 3.6.4.1) des Produkts der Reaktion von DNSAPITC mit D96N zeigt deutlich neben dem Peak für D96N bei 26776.0 Da (berechnet 26782.6 Da) den Produktpeak des DNSAPITC gelabelten D96N bei 27159.0 Da (berechnet 27166.1 Da) (siehe Abb. 119).

Zur Identifizierung der Bindungsstelle des DNSAPITC-Labels wurde eine BrCN-Spaltung des Produkts durchgeführt und mittels LC/MS/MS untersucht (siehe Kapitel 3.6.4.2). Das Totalioncount-Chromatogramm (TIC) wurde durch Einsatz entsprechender Massenfilter nach gelabelten Fragmenten durchsucht. Bei der Filterung wurde kein modifiziertes Fragment gefunden. Im Einklang mit der Literatur ist davon auszugehen, dass es durch die stark aciden Reaktionsbedingungen bei der BrCN-Spaltung zu einer Hydrolyse der Thioharnstoffbindung zwischen BR und Label gekommen ist ^[199].

Zusammenfassend konnte durch massenspektrometrische Untersuchungen die erfolgreiche Anbindung von DNSAPITC an BR nachgewiesen werden. Die Bindungsstelle des ITC konnte aufgrund der Hydrolyse der Linkerbindung während der BrCN-Spaltung nicht identifiziert werden.

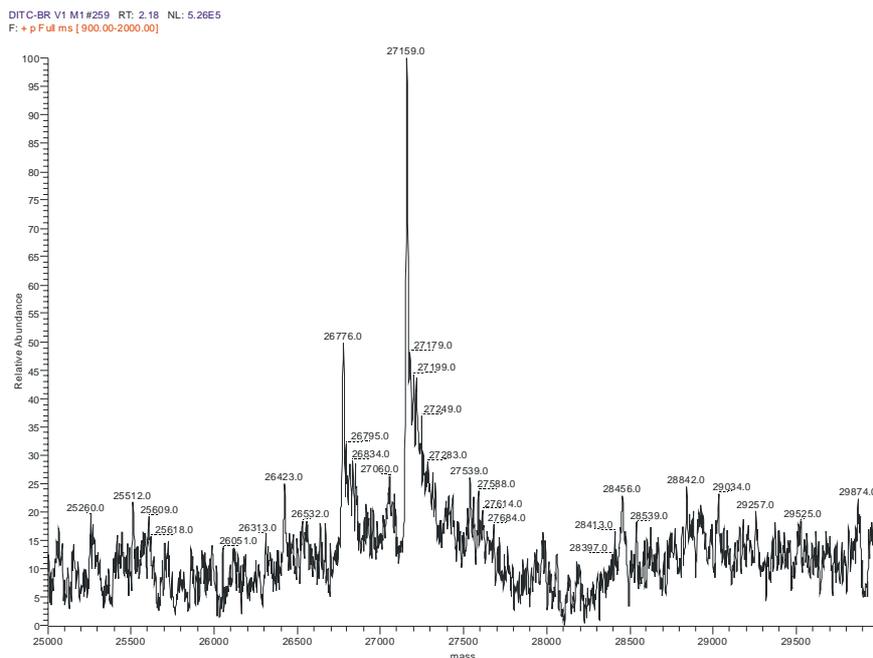


Abb. 119: MS-Messung eines DNSAPITC gelabelten D96N.

6.3.3.1.3 Kopplung mittels Dichlortriazin

Dichlortriazine reagieren mit Nucleophilen, wie Aminen, Thiolen und Hydroxygruppen von Kohlenhydraten (siehe Abb. 120) ^[161].

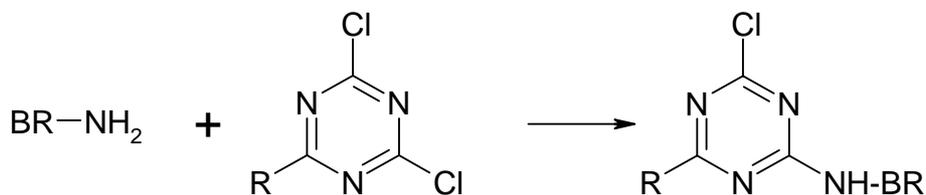


Abb. 120: Reaktionsgleichung für die Kopplung mittels Dichlortriazin.

Zur Veränderung des photochromen Gamut von BR wurden Anbindungen von Reaktivfarbstoffen auf Basis von Dichlortriazinen durchgeführt ^[52]. Als potentielle Bindungsstelle für das Monoaddukt wird hier K40 bzw. K41 postuliert. Allerdings zeigt sich auch, dass es je nach pH Wert des Reaktionsmediums und der Reaktionsdauer zu Polyaddukten kommt, die u.a. auf elektrostatische Wechselwirkungen zurückgeführt werden. Aufgrund der geringen Selektivität bei großer Reaktionsbreite wurde im Rahmen dieser Arbeit auf Experimente mit diesem nicht-klassischen Linkersystem verzichtet.

6.3.3.2 Anbindung an Thiol

Da Wildtyp PM über keine Thiolfunktionalität verfügt, muss durch molekulargenetische Modifizierung mittels Punktmutation ein sterisch-zugängliches Cystein eingeführt werden. Als geeignete Mutante wurde D36C ausgewählt.

6.3.3.2.1 Kopplung mittels Maleinimid

Die Doppelbindung der Maleinimide reagiert bei pH 6.5-7.5 spezifisch mit Thiolgruppen. Bei höheren pH Werten tritt eine Konkurrenzreaktion mit Aminen auf (siehe Abb. 121) ^[160].

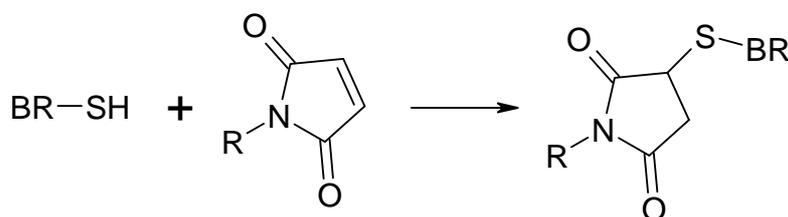


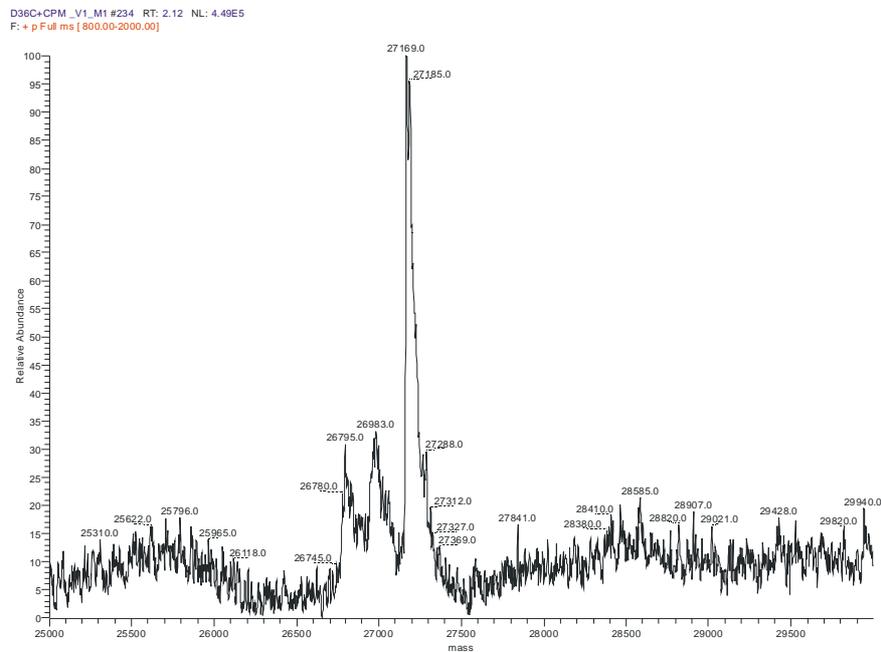
Abb. 121: Reaktionsgleichung für die Kopplung mittels Maleinimid.

In der Literatur werden Umsetzungen von D36C mit Fluorescein-5-maleinimid (FLM) und 7-Diethyl-amino-3-(4'-maleinimidylphenyl)-4-methylcoumarin (CPM) beschrieben ^[47]. Die Untersuchungen zeigten, dass für FLM die Reaktionsausbeute keine starke Funktion des pH Werts des Reaktionsmediums ist. Aufgrund der hohen Selektivität der Maleinimide für Thiole, kann davon ausgegangen werden, dass eine Reaktion nur an Cystein-36 stattfindet.

Beispielhaft für eine Anbindung mittels Maleinimid wurde D36C mit 7-Diethylamino-3-(4'-maleinimidylphenyl)-4-methylcoumarin (CPM) umgesetzt. Hierzu wurden 2.7 mg (100 nmol) entschütztes D36C (siehe Kapitel 3.1.1.5) in 1000 μ L Phosphatpuffer (10 mM, pH 7.2, EDTA 1 mM) suspendiert. Anschließend wurde die Suspension mit 0.5 mg (1250 nmol) CPM in 25 μ L DMF versetzt und gevortext. Die Suspension wird über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach Zentrifugation wurde das Pellet zweimal mit Phosphatpuffer (10 mM, pH 7.2, EDTA 1 mM) und zweimal mit Wasser gewaschen. Zuletzt wurde einmal mit Wasser gewaschen, die Probe erneut in Wasser aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Die massenspektrometrische Analyse (siehe Kapitel 3.6.4.1) des Produkts der Reaktion von CPM mit D36C zeigt deutlich neben dem Peak für D36C bei 26795.0 Da (berechnet 26771.6 Da) den Produktpeak des CPM gelabelten D36C bei 27169.0 Da (berechnet

27174.1 Da) (siehe Abb. 122). Der Massenpeak bei 26983.0 Da konnte nicht eindeutig identifiziert werden. Es könnte sich um Mercaptoethanol geschütztes D36C (berechnet 26847.7 Da) handeln. Die Verschiebung in der Masse könnte in diesem Fall durch Ionenaddukte hervorgerufen werden. Weiterhin wäre ein Precursor von BR denkbar [184].



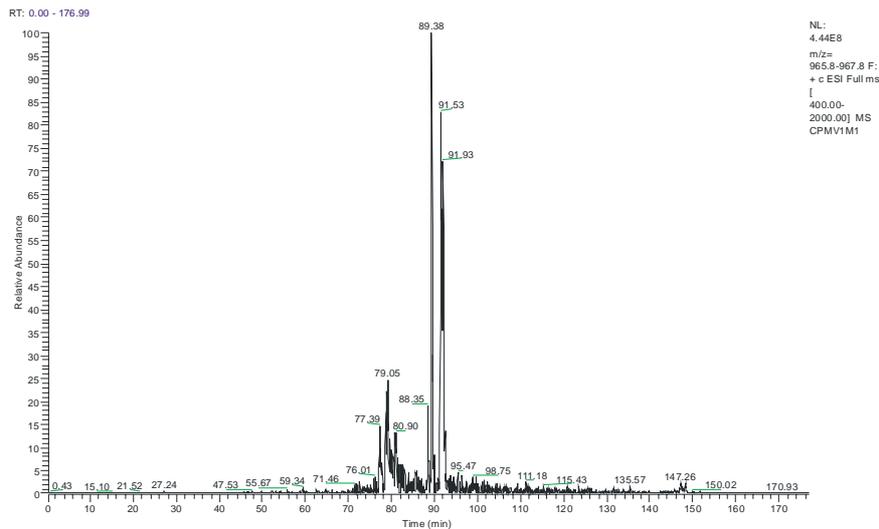


Abb. 123: Massengefiltertes TIC-Chromatogramm eines CPM gelabelten D36C nach Bromcyan-Spaltung (Range 965.8 - 967.8 Da).

In Abb. 124 ist das dem TIC-Peak aus Abb. 123 entsprechende gemittelte Massenspektrum dargestellt. Deutlich zeigen sich bei 1450.6 Da der MH_2^{2+} - und bei 967.0 Da der MH_3^{3+} -Peak des CPM gelabelten Fragments 3 (berechnet (mi) MH^+ 2898.5 Da, MH_2^{2+} 1449.7 Da, MH_3^{3+} 966.8 Da) im Spektrum. Zur weiteren Verifizierung der Anbindung an Fragment 3 wurden im MS/MS-Spektrum die Fragmente des CID zugeordnet (siehe Anhang 8.2.2).

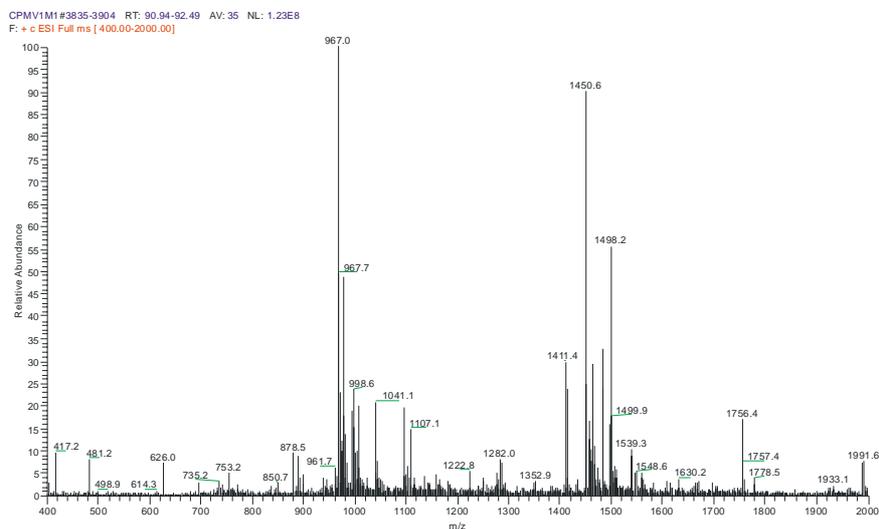


Abb. 124: LC/MS-Messung eines CPM gelabelten D36C nach Bromcyan-Spaltung.

Zusammenfassend konnte durch massenspektrometrische Untersuchungen die erfolgreiche Anbindung von CPM an BR nachgewiesen werden. Als Bindungsstelle des Maleinimids wurde Cystein-36 durch LC/MS/MS Untersuchungen identifiziert. Dies deckt sich mit der in der Literatur für andere Maleinimide (Fluorescein-5-maleinimid (FLM) ^[47]) postulierten Bindungsstelle C36.

6.3.3.3 Anbindung an Glutamin

Da BR N-terminal über das sterisch zugängliche Glutamin-3 verfügt, bietet sich eine enzymatische Bindungsknüpfung mittels Transglutaminase (TGase) an.

6.3.3.3.1 Kopplung mittels Transglutaminase

Durch die enzymatische Aktivität der TGase kann in einer Acyl-Transfer-Reaktion zwischen der γ -Carboxamidgruppe eines Glutamin und der ϵ -Aminogruppe eines Lysin eine ϵ -(- γ -Glutamyl)lysinisopeptidbindung geknüpft werden (siehe Abb. 125) ^[200-202].

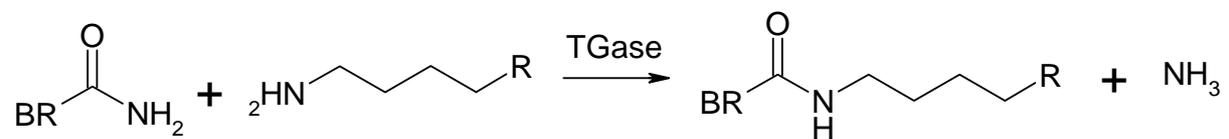


Abb. 125: Reaktionsgleichung für die Kopplung mittels Transglutaminase.

Untersuchungen in der AG Prof. Dr. Hampp zeigten, dass nicht jede γ -Carboxamidgruppe bzw. ϵ -Aminogruppe als Substrat der TGase fungiert ^[49]. Zur Anbindung unterschiedlicher Substrate mit ϵ -Aminogruppenfunktionalität an die Position Q3 in BR wurden bereits Arbeiten ausgeführt ^[49, 95, 196, 203]. Im Folgenden wurde, aufgrund der fundierten Erkenntnisse, auf rudimentäre Experimente zur Selektivität der TGase bei Anbindungen an BR verzichtet und die Anbindung von N_α, N_α -Bis-(carboxymethyl)-L-lysin (NTA-Lys) an BR mittels TGase direkt evaluiert (siehe Kapitel 6.3.4.4).

6.3.4 Auswahl und Evaluierung des Linker II

Zur Anbindung nanoskaliger Funktionseinheiten an die mittels Linker funktionalisierte PM müssen geeignete Kopplungssysteme zur Anbindung der Funktionseinheit an den am BR fixierten Linker ausgewählt werden (siehe Abb. 108). Die Bindung zwischen bifunktionellem Linkersystem und Funktionselement soll universell sein, d.h. ein möglichst breites allgemeingültiges Konzept zur Anbindung nanoskaliger Funktionseinheiten bieten. Im Folgenden werden verschiedene Konzepte diskutiert und durch entsprechende Experimente evaluiert.

6.3.4.1 Anbindung von Crosslinkern

Klassisch werden zur Kreuzkopplung von Proteinen, z.B. für die Bildung von Antikörper-Enzym- oder Hapten-Carrier-Konjugaten, bifunktionelle Linker eingesetzt [160, 161, 191, 192]. Bevorzugt werden hierbei Reagenzien mit unterschiedlichen Selektivitäten der Linkerfunktionen verwendet, da die Verwendung von Linkern mit gleicher Selektivität der funktionellen Gruppen oft zu unerwünschten Mischprodukten führt. Am Häufigsten werden hetero-bifunktionelle Linker auf Basis von N-Hydroxysuccinimidestern und Maleinimiden verwendet (siehe Abb. 126, Kapitel 6.3.3.1.1 & Kapitel 6.3.3.2.1). Somit ergibt sich eine Reaktivität auf Amin und Thiol, wobei in einer Umsetzung üblicherweise zuerst ein Protein durch Anbindung des Linkers am Amin aktiviert wird und dann mittels Bindung über das Thiol eines zweiten Proteins das Biokonjugat aufgebaut wird.

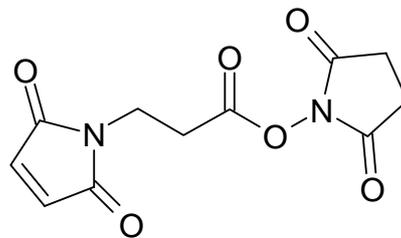


Abb. 126: 3-Maleinimido-propionsäure-N-succinimidylester (MPOS) als Beispiel eines bifunktionellen Linkers.

In der Vergangenheit wurde erfolglos versucht bifunktionelle Linker zur gerichteten chemischen Kopplung von PM zu verwenden [47, 196]. Hierbei zeigte sich, dass der Linker erfolgreich an der PM befestigt werden konnte, allerdings die Bindung zum zweiten PM-Fragment nicht erfolgte. Es ist davon auszugehen, dass aufgrund der hohen sterischen Ansprüche für die Bindung zwischen zwei PM-Fragmenten und der geringen Mobilität der Fragmente die Deaktivierung des Linkers durch Hydrolyse dominant wird und somit keine Anbindung mehr erfolgen kann.

Zusammenfassend eignet sich die Anbindung an BR mittels hetero-bifunktionelle Linker nur für niedermolekulare Verbindungen. Für nanoskalige Funktionseinheiten müssen andere Kopplungssysteme ohne Hydrolyseneigung verwendet werden.

6.3.4.2 Anbindung von Oligos

Oligonukleotide zeigen aufgrund ihrer Sequenzcodierung eine hohe Hybridisierungsspezifität. Bei der antiparallelen Zusammenlagerung zweier Stränge bilden zwei zueinander komplementäre Basenpaare 3 (Guanin/Cytosin) bzw. 2 (Thymin/Adenin) gerichtete Wasserstoffbrückenbindungen aus. Die Wasserstoffbrückenbindungen werden nur ausgebildet, wenn die Geometrie genau passt, d.h. sich komplementäre Basenpaare gegenüber liegen. Für eine bei Raumtemperatur stabile Kopplung zwischen zwei Oligonukleotiden ist aufgrund der geringen Bindungsenergie der Wasserstoffbrückenbindung eine Zahl von etwas 10-20 aufeinander folgenden komplementären Basenpaaren erforderlich ^[4].

Durch Anbindung von Oligos an nanoskalige Einheiten können diese funktionalisiert werden. Die Anbindung der Oligos erfolgt hierbei mittels klassischer Biokonjugatchemie ^[160, 161, 191, 192] - geeignete mit Linkern versehene Oligonukleotide sind kommerziell erhältlich. Durch anschließende Hybridisierung können die mit Oligos versehenen nanoskaligen Einheiten dann verknüpft werden ^[204].

Der Verbindungsaufbau an PM mittels Oligonukleotiden wird zurzeit aktiv durch andere Gruppenmitglieder der AG Prof. Hampp erforscht und soll somit nicht Gegenstand dieser Arbeit sein.

6.3.4.3 Anbindung von Biotin

Neben den Oligonucleotiden ist in der Biochemie eine Vielzahl von weiteren hochgradig selektiven Bindungssystemen bekannt. Systeme, wie z.B. Antigen-Antikörper, Ligand-Rezeptor und Enzym-Substrat, zeigen trotz nicht-kovalenter Bindung, aufgrund hoher sterischer Komplementarität, Wasserstoffbrücken- bzw. Ionenbindungen, van-der-Waals-Kräften und/oder hydrophoben Wechselwirkungen, dennoch hohe Bindungsenergien ^[67].

Die meistverbreitete Methode zur nicht-kovalenten Bindungsknüpfung ist die Biotin-Avidin (bzw. Streptavidin) Bindung. Die Bindeproteine Avidin und Streptavidin verfügen jeweils über vier Bindungsstellen, die mit einer Bindungskonstante von 10^{15} mol^{-1} eine hochgradig selektive und stabile Bindung mit Biotin ausbilden (siehe Abb. 127) ^[67]. Im Folgenden wurde versucht seitenspezifisch eine Biotinfunktionalität in BR einzuführen.

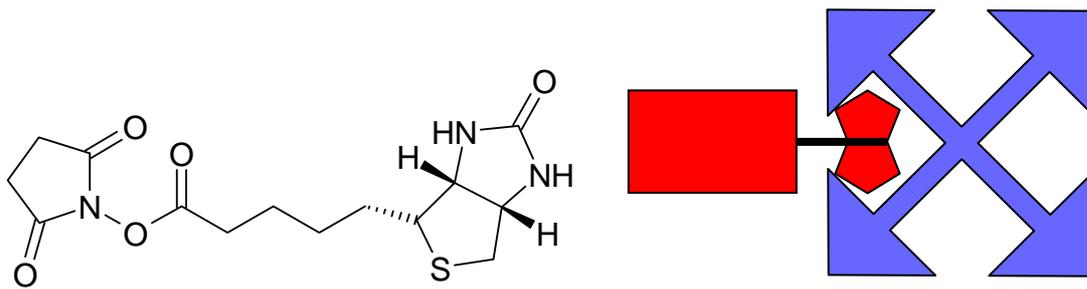


Abb. 127: Links: NHS-Biotin als Beispiel für ein Biotinylierungsreagenz. Rechts: Schematische Skizze der Bindung zwischen Biotin und Avidin bzw. Streptavidin.

6.3.4.3.1 Funktionalisierung der cytoplasmatischen Seite von PM

Die Biotinylierung von Proteinen durch Anbindung an die Thiolgruppe von Cystein mittels Maleinimid ist eingehend in der Literatur beschrieben^[205] und entsprechende Reagenzien sind kommerziell erhältlich.

Im Folgenden wurde versucht D36C mittels N-Biotinoyl-N'-(6-maleinimido-hexanoyl)hydrazid (BioM) zu biotinylieren. Hierzu wurden 2.7 mg (100 nmol) entschütztes D36C (siehe Kapitel 3.1.1.5) in 1000 μ L Phosphatpuffer (10 mM, pH 7.2, EDTA 1 mM) suspendiert. Anschließend wurde die Suspension mit 2.3 mg (5000 nmol) BioM in 50 μ L DMSO versetzt und gevortext. Die Suspension wird über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach Zentrifugation wurde das Pellet zweimal mit Phosphatpuffer (10 mM, pH 7.2, EDTA 1 mM) und zweimal mit Wasser gewaschen. Zuletzt wurde einmal mit Wasser gewaschen, die Probe erneut in Wasser aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Die massenspektrometrische Analyse (siehe Kapitel 3.6.4.1) des Produkts der Reaktion von BioM mit D36C zeigt deutlich neben dem Peak für D36C bei 26796.0 Da (berechnet 26771.6 Da) den Produktpeak des BioM gelabelten D36C bei 27220.0 Da (berechnet 27223.1 Da) (siehe Abb. 122). Der Massenpeak bei 27020.0 Da konnte nicht eindeutig identifiziert werden. Es könnte sich um Mercaptoethanol geschütztes D36C (berechnet 26847.7 Da) handeln. Die Verschiebung in der Masse könnte in diesem Fall durch Ionenaddukte hervorgerufen werden. Weiterhin wäre ein Precursor von BR denkbar^[184].

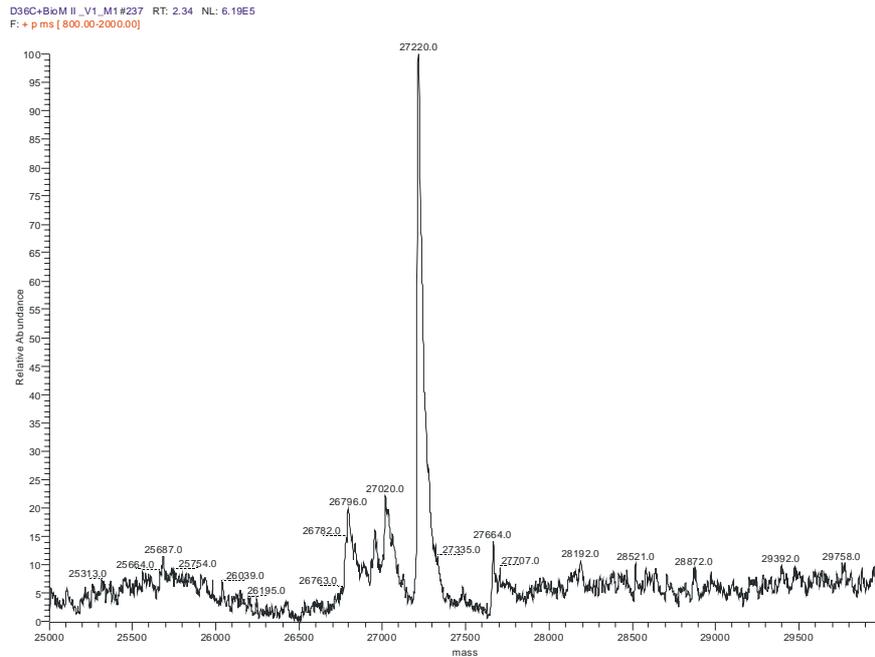


Abb. 128: MS-Messung eines BioM gelabelten D36C.

Zusammenfassend konnte durch massenspektrometrische Untersuchungen die erfolgreiche Anbindung von BioM an BR nachgewiesen werden. Entsprechend Kapitel 6.3.3.2.1 ergibt sich als Bindungsstelle des Maleinimids Cystein-36.

6.3.4.3.2 Funktionalisierung der extrazellulären Seite von PM

Auch die Biotinylierung von Proteinen durch Anbindung mittels NHS an primäre Amine ist eingehend in der Literatur beschrieben ^[160] und entsprechende Reagenzien sind kommerziell erhältlich.

Im Folgenden wurde versucht D96N an K129 mittels gängiger Reagenzien zu biotinylieren:

- Biotinamidohexansäure-3-sulfo-N-hydroxysuccinimidester Na-Salz (556.6 Da)
- Biotin-3-sulfo-N-hydroxysuccinimidester Na-Salz (443.4 Da)
- 6-(((6-((Biotinoyl)amino)hexanoyl)amino)hexansäure-3-sulfo-N-hydroxysuccinimidester Na-Salz (669.8 Da)
- Biotinamidohexanoyl-6-amino-hexansäure-N-hydroxysuccinimidester (567.7 Da)
- Biotin-N-hydroxysuccinimidester (341.4 Da)
- Biotinamidohexansäure-N-hydroxysuccinimidester (454.5 Da)

Hierzu wurden 4.2 mg (160 nmol) D96N in 1600 μ L Boratpuffer (10 mM, pH 8.5) suspendiert. Anschließend wurde die Suspension mit 1600 nmol des entsprechenden Biotinylierungsreagenz versetzt und gevortext, wobei nicht-wassergängige Reagenzien zuvor in 200 μ L DMSO gelöst wurden. Die Suspension wurde für 24 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zentrifugation wurde das Pellet dreimal mit Boratpuffer (10 mM, pH 8.5) gewaschen. Danach wurde das Pellet in Boratpuffer (10 mM, pH 8.5) aufgenommen und über Nacht stehen gelassen. Nach Zentrifugation wurde das Pellet dreimal mit KCl-Lösung (100 mM) gewaschen. Zuletzt wurde einmal mit Wasser gewaschen, die Probe erneut in Wasser aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Massenspektrometrische Analysen (siehe Kapitel 3.6.4.1) der Produkte der Reaktionen von Biotin-NHS-Estern mit D96N zeigten jeweils nur die Masse von unmodifiziertem BR. Es ist davon auszugehen, dass die Hydrolyse des Linkers gegenüber der Anbindung dominant ist und deshalb keine Umsetzung stattfindet (siehe Kapitel 6.3.3.1.1). Um die Reaktion in Richtung Anbindung zu begünstigen, wird in der Literatur vorgeschlagen das Reaktionsvolumen möglichst gering zu halten^[47]. Die Reaktionen wurden hierzu erneut unter Beibehaltung der molaren Mengen in 1/10 des Reaktionsvolumens durchgeführt. Auch hier konnte massenspektrometrisch keine Umsetzung nachgewiesen werden.

Vergleichend zeigt sich (siehe Kapitel 6.3.3.1.1), dass die Anbindung an BR nicht für alle NHS-Ester mit gleichartigen Reaktionsausbeuten stattfindet. Die für das verwendete Reagenz intrinsische Hydrolyseneigung der NHS-Gruppe begrenzt hier die Bindungsfähigkeit an BR. Um ein allgemeingültiges Konzept zur Anbindung an die ϵ -Aminogruppe von BR zu entwickeln, wurde eine Thiolgruppe am Lysin eingeführt.

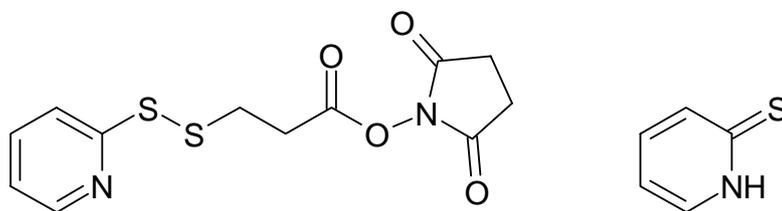


Abb. 129: Links: N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat (SPDP). Rechts: Pyridin-2-thion.

N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat (SPDP) ist eins der bekanntesten Reagenzien zur Einführung einer Thiolfunktionalität (siehe Abb. 129). Die NHS-Ester-Funktion von SPDP reagiert mit einer primären Aminogruppe unter Bildung einer Amidbindung (siehe

Kapitel 6.3.3.1.1). Durch reduktives Entschützen, z.B. mit PBU_3 (siehe Kapitel 3.1.1.5), wird die Thiolgruppe unter Abspaltung von Pyridin-2-thion freigesetzt und kann durch klassische Kopplungschemie weiter funktionalisiert werden (siehe Kapitel 6.3.3.2) ^[160].

Im Folgenden wurde versucht D96N an K129 mittels SPDP zu funktionalisieren. Die Reaktion wurde zur Optimierung der Ausbeute im reduzierten Reaktionsvolumen durchgeführt (siehe oben). Hierzu wurden 2 mg (75 nmol) D96N in 160 μL Boratpuffer (10 mM, pH 8.5) suspendiert. Anschließend wurde die Suspension mit 2.5 mg (8000 nmol) SPDP in 20 μL DMSO versetzt und gevortext. Die Suspension wurde für 4 h bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation wurde das Pellet dreimal mit Boratpuffer (10 mM, pH 8.5) gewaschen. Danach wurde das Pellet in Boratpuffer (10 mM, pH 8.5) aufgenommen und über Nacht stehen gelassen. Nach Zentrifugation wurde das Pellet dreimal mit KCl-Lösung (100 mM) gewaschen. Zuletzt wurde einmal mit Wasser gewaschen, die Probe erneut in Wasser aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

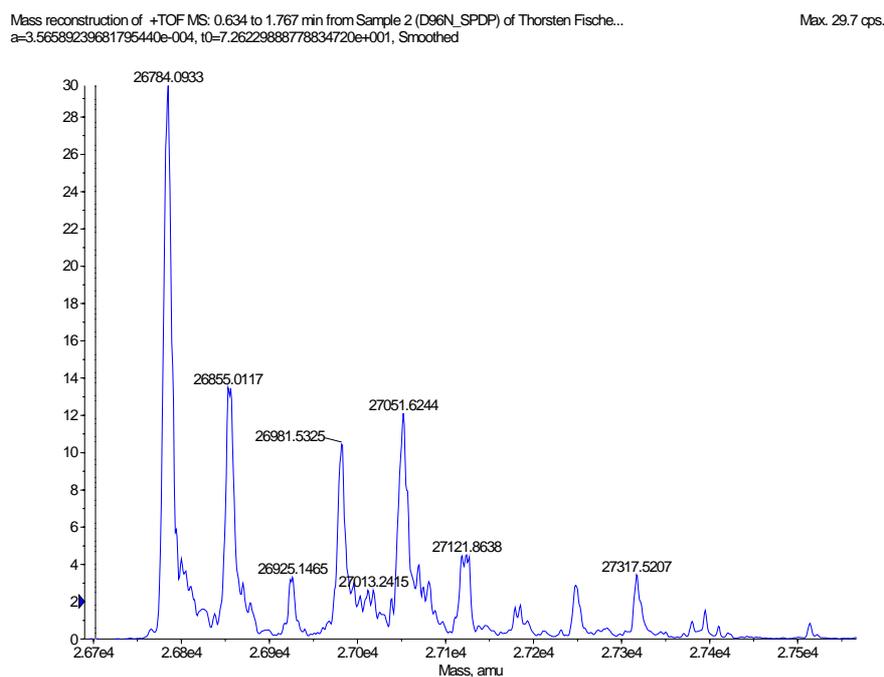


Abb. 130: MS-Messung eines SPDP gelabelten D96N.

Die massenspektrometrische Analyse (siehe Kapitel 3.6.4.1) des Produkts der Reaktion von SPDP mit D96N zeigt deutlich neben dem Peak für D96N bei 26784.1 Da (berechnet 26782.6 Da) den Produktpeak des SPDP gelabelten D96N bei 26981.5 Da (berechnet 26979.9 Da) (siehe Abb. 130). Im Spektrum sind weiterhin Massenpeaks zu finden, die ca. 70 Da über den jeweiligen Massen der identifizierten Peaks liegen. Dieses Verhalten zeigte

sich bei allen weiteren Umsetzungen mit SPDP und kann somit ursächlich auf die Reaktion von BR mit SPDP zurückgeführt werden. Die beobachteten Massen konnten keiner Nebenreaktion zugeordnet werden. Die zusätzlichen Peaks werden bei den folgenden Reaktionen mit SPDP nicht mehr gesondert diskutiert.

Zum Nachweis der Aktivität der eingeführten Thiolgruppe wurde das mit SPDP funktionalisierte D96N entsprechend der Vorschrift für D36C entschützt (siehe Kapitel 3.1.1.5) und mit CPM gemäß der Vorschrift in Kapitel 6.3.3.2.1 umgesetzt.

Die massenspektrometrische Analyse (siehe Kapitel 3.6.4.1) des Produkts der Reaktion von CPM mit SPDP gelabeltem D96N zeigt deutlich neben dem Peak für D96N bei 26783.0 Da (berechnet 26782.6 Da) den Produktpeak des CPM-SPDP gelabelten D96N bei 27271.0 Da (berechnet 27273.2 Da) (siehe Abb. 131). Da kein Massenpeak für das mit SPDP gelabelte D96N im Spektrum vorzufinden ist, ist von einer quantitativen Umsetzung des SPDP-D96N mit CPM auszugehen.

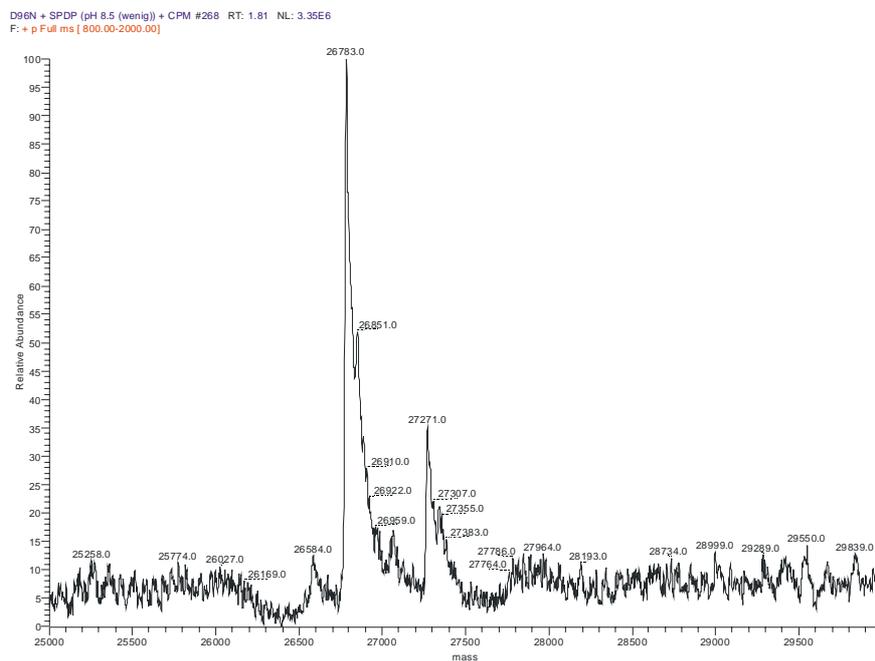


Abb. 131: MS-Messung eines SPDP-CPM gelabelten D96N.

Zur Umsetzung mit BioM wurde das mit SPDP funktionalisierte D96N entsprechend der Vorschrift für D36C entschützt (siehe Kapitel 3.1.1.5) und mit BioM gemäß der Vorschrift in Kapitel 6.3.4.3.1 umgesetzt.

Die massenspektrometrische Analyse (siehe Kapitel 3.6.4.1) des Produkts der Reaktion von BioM mit SPDP gelabeltem D96N zeigt deutlich neben dem Peak für D96N bei 26778.0 Da (berechnet 26782.6 Da) den Produktpeak des BioM-SPDP gelabelten D96N bei 27319.0 Da (berechnet 27321.9 Da) (siehe Abb. 132). Da kein Massenpeak für das mit SPDP gelabelte D96N im Spektrum vorzufinden ist, ist von einer quantitativen Umsetzung des SPDP-D96N mit BioM auszugehen.

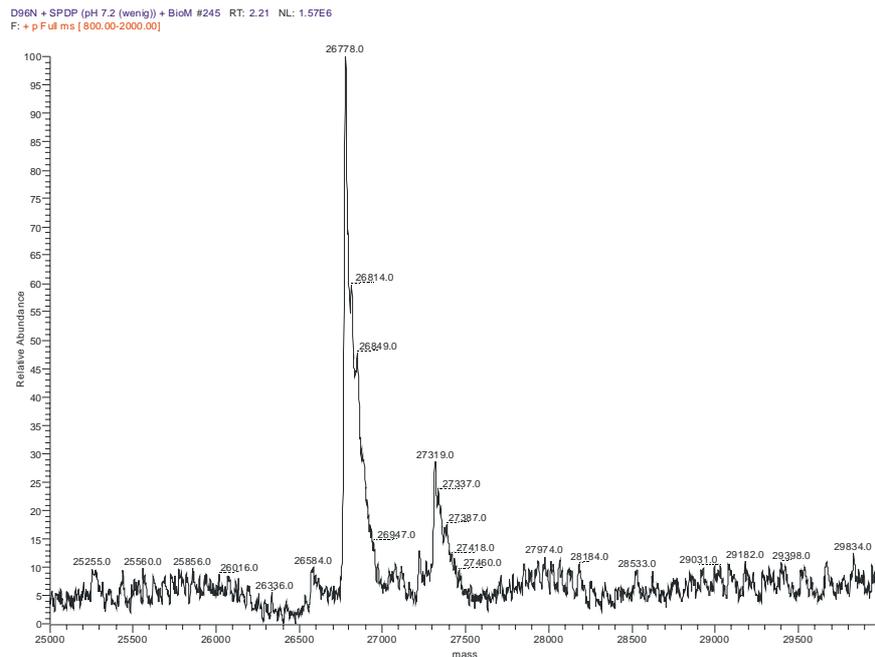


Abb. 132: MS-Messung eines SPDP-BioM gelabelten D96N.

Zusammenfassend konnte durch massenspektrometrische Untersuchungen die erfolgreiche Anbindung von BioM an SPDP gelabeltes BR nachgewiesen werden. Entsprechend Kapitel 6.3.3.1.1 ergibt sich als Bindungsstelle Lysin-129.

6.3.4.4 Anbindung von NTA

Die immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) dient zur schnellen Isolierung von Proteinen. Die am häufigsten verwendeten Säulen sind mit Nitrolessigsäure (NTA) funktionalisiert. NTA zeigt Metall-chelatierende Eigenschaften und bildet mit Ni^{2+} und zwei Histidin-Molekülen einen stabilen oktaedrisch-kordinierten Komplex (siehe Abb. 133) [206]. Das mittels Ni/NTA-IMAC zu isolierende Protein wird durch Mutation mit einem Polyhistidin Schwanz (His-Tag) versehen, in einem Organismus wie z.B. *E. coli* exprimiert und anschließend chromatographisch abgetrennt [67].

Ausgehend von dem kommerziell erhältlichen N_{α},N_{α} -Bis-(carboxymethyl)-L-lysin (NTA-Lys) wurde im Folgenden versucht seitenspezifisch eine NTA-Funktionalität in BR einzuführen.

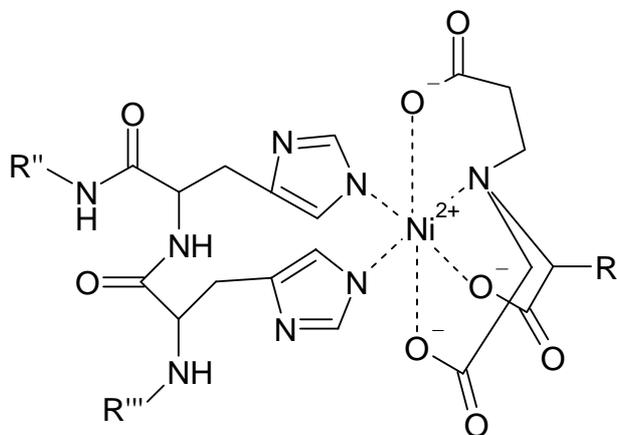


Abb. 133: Histidin-Nickel-NTA-Komplex.

6.3.4.4.1 Funktionalisierung der cytoplasmatischen Seite von PM

NTA-Lys verfügt über keine aktive Linkerfunktionalität, es bietet sich jedoch an die primäre Aminogruppe des NTA-Lys durch Reaktion mit einem bifunktionellen Linker zu aktivieren. Nahe liegend bietet sich hierzu der bereits zuvor diskutierte Linker MPOS an (siehe Kapitel 6.3.4.1) ^[207]. Nach Umsetzung entsteht ein maleinimid-aktiviertes NTA-Lys-Reagenz, das an dem Thiol des C36 angebunden werden kann.

Hierzu wurden 3.9 mg (15 μ mol) NTA-Lys in 150 μ L Phosphatpuffer (500 mM, pH 7.2) suspendiert. Anschließend wurde die Lösung mit 0.4 mg (1.5 μ mol) MPOS in 20 μ L ACN versetzt und gevortext. Die Lösung wird für 4 h bei 37 °C inkubiert. Zur Umsetzung mit BR wurde die Lösung mit 2.7 mg (100 nmol) entschütztem D36C (siehe Kapitel 3.1.1.5) in 250 μ L Phosphatpuffer (10 mM, pH 7.2, EDTA 1 mM) versetzt und gevortext. Die Suspension wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach Zentrifugation wurde das Pellet zweimal mit Phosphatpuffer (10 mM, pH 7.2, EDTA 1 mM) und zweimal mit Wasser gewaschen. Zuletzt wurde einmal mit Wasser gewaschen, die Probe erneut in Wasser aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

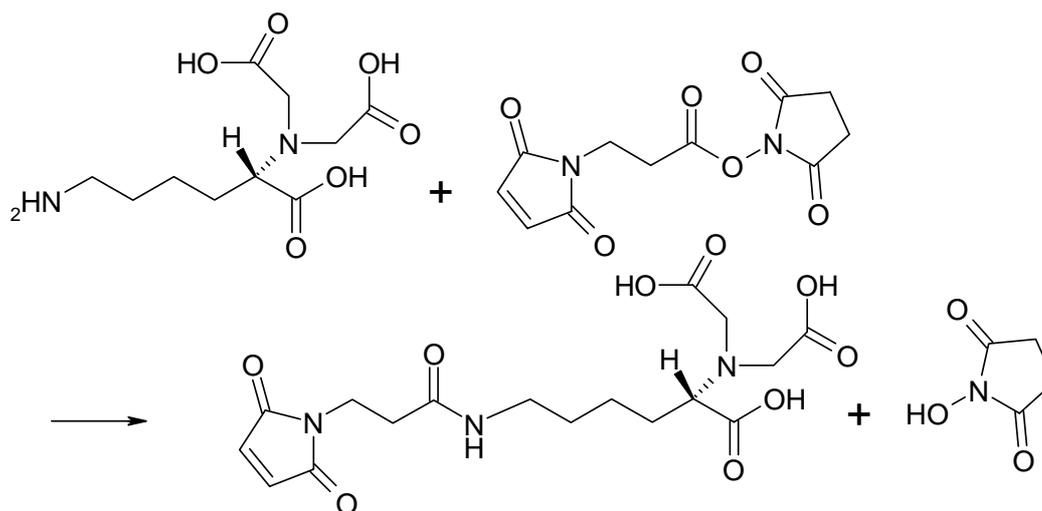


Abb. 134: Anbindung von MPOS and NTA.

Die massenspektrometrische Analyse (siehe Kapitel 3.6.4.1) des Produkts der Reaktion von NTA-MPOS mit D36C zeigt deutlich neben dem Peak für D36C bei 26784.5 Da (berechnet 26771.6 Da) den Produktpeak des NTA-MPOS gelabelten D36C bei 27183.9 Da (berechnet 27185.0 Da) (siehe Abb. 135). Der Massenpeak bei 26939.7 Da kann auf das Hydrolyseprodukt HO-MPOS-D36C (berechnet 26940.7 Da) zurückgeführt werden. Der Massenpeak bei 27841.2.0 Da konnte nicht eindeutig identifiziert werden, möglicherweise handelt es sich um einen Precursor von BR ^[184].

Die Hydrolyse des MPOS tritt als Konkurrenzreaktion der Anbindung des NTA-Lys am MPOS auf und ist typisch für NHS-Ester (siehe Kapitel 6.3.3.1.1). Somit liegen für die anschließende Anbindung - Reaktion des Maleinimids mit Cystein - OH-MPOS und NTA-MPOS konkurrierend vor. Die hier gewählten Reaktionsbedingungen wurden bereits durch Iteration auf einen möglichst geringen Hydrolyseanteil am Produkt optimiert. Eine Steigerung der Reaktionsausbeute kann somit nur noch durch eine Abtrennung des Hydrolyseprodukts erfolgen. Eine Auftrennung mittels präparativer HPLC erweist sich als schwierig, da beide Produkte über Carbonsäurefunktionen verfügen und somit sehr ähnliche Retentionszeiten auf Standardsäulen zeigen. Ideal wäre eine Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie unter Nutzung der NTA-His-Wechselwirkung. Hierfür würde eine His-modifizierte Säule benötigt werden. Solche Säulen sind im Gegensatz zu NTA-modifizierten Säulen nicht kommerziell erhältlich. Eine Möglichkeit zu Herstellung wäre die Anbindung von Histidin an eine kommerziell erhältliche NHS-Ester-aktivierte Säule.

Durch die hohe strukturelle Verwandtschaft der einzelnen Analytmoleküle, kann von einer gleichartigen Ionisierbarkeit ausgegangen werden und das Spektrum somit semi-quantitativ betrachtet werden. So ergibt sich eine Reaktionsausbeute für NTA-MPOS-D36C von ca. 20 %. Bei durchschnittlich 18,000 BR-Einheiten pro PM ergeben sich mit 3,600 modifizierten Einheiten genügend potentielle Bindungsstellen für nanoskalige Funktionseinheiten.

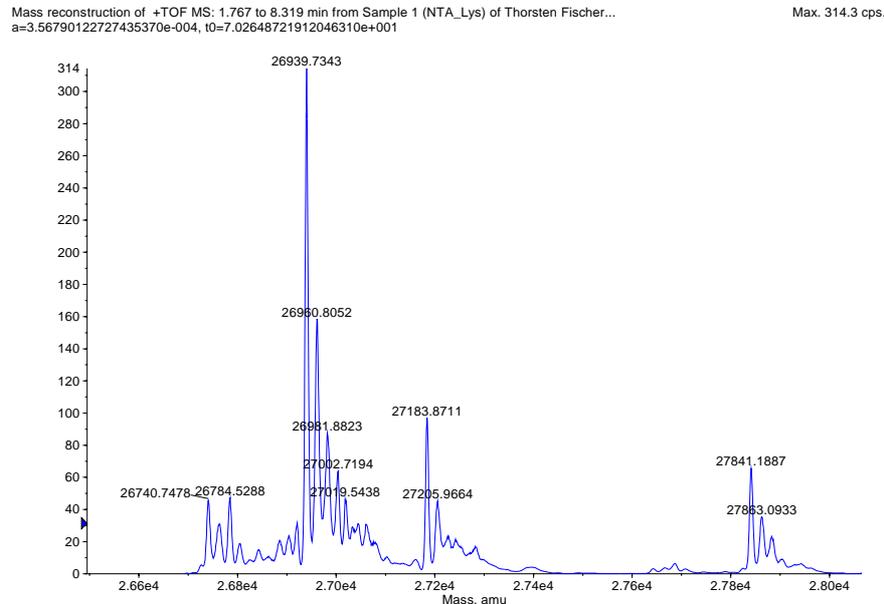


Abb. 135: MS-Messung eines MPOS-NTA gelabelten D36C.

Zusammenfassend konnte durch massenspektrometrische Untersuchungen die erfolgreiche Anbindung von MPOS-NTA an BR nachgewiesen werden. Entsprechend Kapitel 6.3.3.2.1 ergibt sich als Bindungsstelle Cystein-36.

6.3.4.4.2 Funktionalisierung der extrazellulären Seite von PM

Zur Funktionalisierung der extrazellulären Seite von PM mit NTA wurden verschiedene Ansätze verfolgt:

- Enzymatische Anbindung an Q3 mittels TGase
- Anbindung an K129 mittels ITC (siehe Kapitel 6.3.3.1.3)
- Anbindung an K129 mittels SPDP und MPOS

N_{α},N_{α} -Bis-(carboxymethyl)-L-lysin (NTA-Lys) verfügt als Lysinderivat über eine ϵ -Aminogruppenfunktionalität. Im Folgenden wurde versucht NTA-Lys mittels TGase in enzymatisch-katalysierten Reaktion anzubinden. Hierzu wurden 0.4 mg (16 nmol) D96N in 100 μ L

Trispuffer (30 mM, pH 7.2) suspendiert. Anschließend wurde die Suspension mit 10.5 µg (40 nmol) NTA-Lys & 10 µL BTGase (1 U / 100 µL) versetzt und gevortext. Die Suspension wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach Zentrifugation wurde das Pellet zweimal mit Trispuffer (30 mM, pH 7.2) und zweimal mit Wasser gewaschen. Zuletzt wurde einmal mit Wasser gewaschen, die Probe erneut in Wasser aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Eine massenspektrometrische Analyse des Produkts der enzymatischen Reaktion von NTA-Lys mit BR zeigte nur die Masse von unmodifiziertem BR. Da die Aktivität der TGase vor der Reaktion bestätigt wurde (siehe Kapitel 3.1.2) und bereits zuvor der Nachweis geführt wurde, dass Q3 in BR ein Substrat der TGase ist ^[49, 203], ist davon auszugehen das NTA-Lys kein Substrat der TGase darstellt.

Wie in Kapitel 6.3.3.1.2 dargestellt, binden hydrophile Reagenzien mittels ITC-Linker selektiv an K129. Analog zu der in der Literatur beschriebenen Synthese von N_α,N_α-Bis-(carboxymethyl)-4-isothiocyanatophenylalanin ^[208], wurde im Folgenden versucht NTA-Lys mit einer ITC-Funktionalität zu versehen. Hierzu wird zur Übertragung der Thiocarbonylgruppe auf die ε-Aminogruppe des NTA-Lys Thiophosgen eingesetzt (siehe Abb. 136) ^[209].

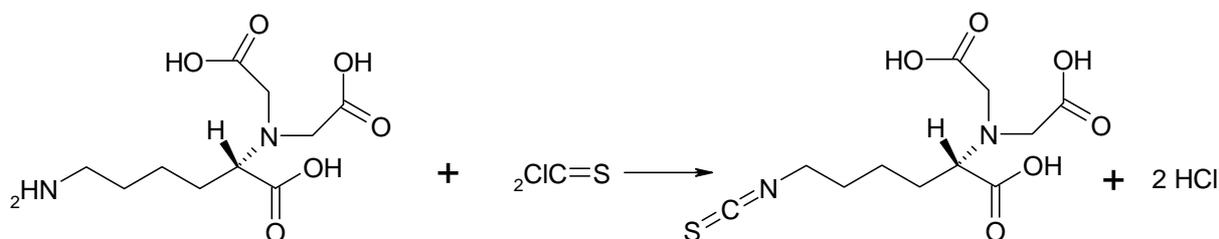


Abb. 136: Reaktionsgleichung für die Einführung einer ITC-Gruppe in NTA-Lys.

Hierzu wurden 34 mg (130 µmol) NTA-Lys in 1200 µL HCl (3 M) suspendiert. Anschließend wurde die Lösung mit 224 mg (1950 µmol) Thiophosgen (80% v/v in CHCl₃) versetzt und gevortext. Die Suspension wurde für 6 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Lösungsmittel und restliche Thiophosgen an der Speed Vac (siehe Kapitel 3.8.3) entfernt. Die Probe wurde bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Eine massenspektrometrische Analyse des Produkts zeigte nur die Masse von unmodifiziertem NTA-Lys. In einer Umsetzung des Produkts mit D96N gemäß den Standardbedingungen für eine ITC-Anbindung (siehe Kapitel 6.3.3.1.2) konnte keine

Modifikation des BR festgestellt werden. Auch bei einer In-situ-Reaktionsführung ohne Entfernung der Lösungsmittel an der Speed Vac wurde massenspektrometrisch keine Anbindung nachgewiesen. Es ist davon auszugehen, dass aufgrund der geringeren Reaktivität von Alkylaminen im Vergleich zu Arylaminen die Übertragung der Thiocarbonylgruppe auf NTA-Lys ohne Erfolg bleibt ^[208, 209].

Zur Umsetzung mit MPOS-NTA wurde das mit SPDP funktionalisierte D96N entsprechend der Vorschrift für D36C entschützt (siehe Kapitel 3.1.1.5) und mit MPOS-NTA gemäß der Vorschrift in Kapitel 6.3.4.4.1 umgesetzt.

Die massenspektrometrische Analyse (siehe Kapitel 3.6.4.1) des Produkts der Reaktion von NTA-MPOS mit SPDP gelabelten D96N zeigt neben dem Peak für D96N bei 26781.3 Da (berechnet 26782.6 Da) den Produktpeak des NTA-MPOS-SPDP gelabelten D96N bei 27282.8 Da (berechnet 27284.1 Da) (siehe Abb. 137). Der Massenpeak bei 27037.5 Da kann auf das Hydrolyseprodukt HO-MPOS-SPDP-D96N (berechnet 27039.8 Da) zurückgeführt werden (siehe Kapitel 6.3.4.4.1).

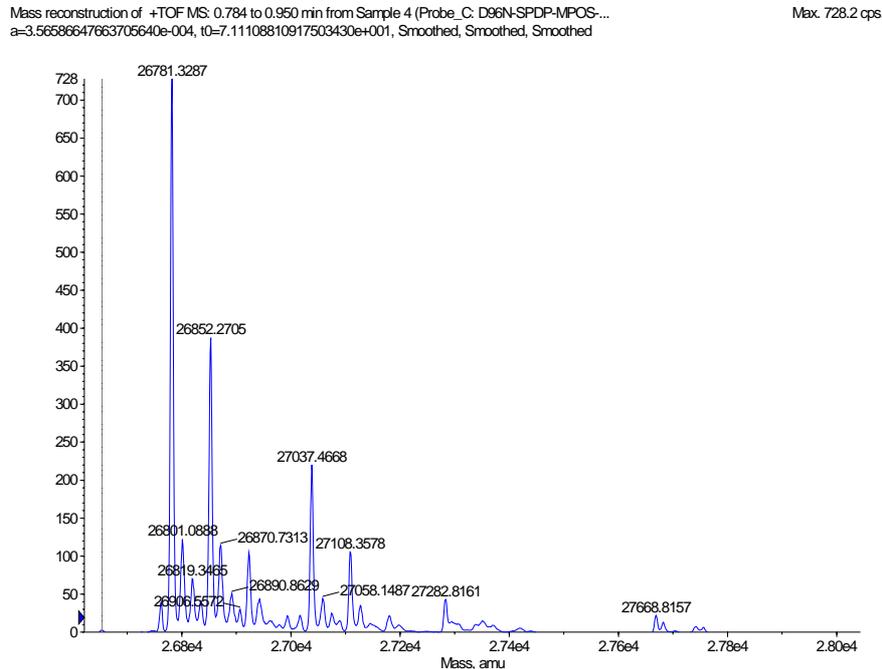


Abb. 137: MS-Messung eines SPDP-MPOS-NTA gelabelten D96N.

Zusammenfassend konnte durch massenspektrometrische Untersuchungen die erfolgreiche Anbindung von NTA-MPOS an SPDP gelabeltes BR nachgewiesen werden. Allerdings ergibt sich durch die dreistufige Reaktionsführung (1. Anbindung von SPDP an D96N, 2.

Umsetzung MPOS & NTA und 3. Anbindung von NTA-MPOS an SPDP-D96N) in Verbindung mit den jeweiligen Hydrolysekonkurrenzreaktionen nur eine geringe Reaktionsausbeute innerhalb einer komplexen Produktmischung. Entsprechend Kapitel 6.3.3.1.1 ergibt sich als Bindungsstelle Lysin-129.

6.3.5 Assemblierung von Hybrid-Bio-Systemen

Das Kapitel 6.3.4 zusammenfassend, wurden Methoden zur seitenspezifischen Anbindung von BR mit NTA und Biotin etabliert. Auf Basis dieser Funktionalisierungen ist eine Vielzahl von Hybrid-Bio-Systemen denkbar.

Die Avidin-Biotin-Wechselwirkung wird u.a. zum Aufbau von nichtkovalenten DNA-Protein- und Protein-Protein-Konjugaten und zur Fixierung von Proteinen und DNA auf Oberflächen von z.B. Nanopartikeln eingesetzt ^[204]. Durch die erfolgreiche seitenspezifische Biotinylierung von BR kann somit dieser bereits etablierte Anwendungsbereich erschlossen werden. Der Aufbau von Konjugaten mittels der NTA-His-Wechselwirkung wurde bisher nur Ansatzweise in der Literatur beschrieben ^[207, 210, 211]. Hingegen zur extrem stabilen Avidin-Biotin-Bindung, kann die NTA-His-Bindung trotz hoher Selektivität und Affinität durch Einsatz geeigneter Reagenzien unter Erhalt der Funktionalität der Bindungspartner gespalten werden. Somit ergibt sich eine "schaltbare Bindung", die zur reversiblen Knüpfung von Konjugaten verwendet werden kann. Interessant ist dieses Bindungskonzept vor allem durch die hohe Anzahl von verfügbaren His-getagten Proteinen. Durch die Standardisierung mittels IMAC, liegen fast alle wissenschaftlich und kommerziell relevanten Proteine und Enzyme in einer His-getagten Variante vor. Somit ergibt sich ad hoc eine Vielzahl möglicher nanoskaliger Funktionseinheiten zur Anbindung.

Im Folgenden soll exemplarisch, anhand des green fluorescent protein (GFP), die reversible Anbindung eines His-getagten Proteins an PM, dargestellt werden. GFP ist ein aus der pazifischen Qualle *Aequorea victoria* isoliertes Protein. Die 238 Aminosäurebausteine umfassende Polypeptidkette bildet eine Tertiärstruktur aus, die aus einem fassartig geschlossenen elfsträngigen β -Faltblatt (β -Barrel), das von einer zentralen α -Helix durchzogen wird, besteht. Das Protein zeigt unter Anregung mit längerwelligem UV-Licht eine intensive grüne Fluoreszenz. Anwendung findet das Protein als biologische Fluoreszenzsonde zur Untersuchung der Genexpression sowie zur Lokalisierung von Proteinen in lebenden Zellen ^[212].

In der folgenden Reaktion wurde zunächst NTA-getagte PM vom Typ D36C (siehe Kapitel 6.3.4.4.1) mit Ni-Ionen beladen und dann His-getagtes GFP angebunden. Zur reversiblen Bindungsspaltung wurde Imidazol verwendet, das mit dem gebundenen Histidin um die Metallbindungsplätze am NTA konkurriert und im Überschuss eingesetzt das Histidin verdrängt. Zur Abspaltung besonders fest am BR gebundener Proteine können auch Lösungen von EDTA eingesetzt werden, welches als stärkerer Komplexbildner das Ni-Ion aus der NTA-His-Bindung entfernt und somit die Bindung löst ^[67, 213].

Zum Laden der NTA-Gruppen mit Ni-Ionen wurden 0.2 mg (8 nmol) D96N in 1000 μ L Wasser suspendiert. Anschließend wurde die Suspension mit 500 μ L CaCl_2 -Lsg. (50 mM) versetzt und gevortext. Die Suspension wurde für 10 min inkubiert. Nach Zentrifugation wurde das Pellet zweimal mit Wasser gewaschen. Das Pellet wurde in 1000 μ L Wasser suspendiert. Die Suspension mit 500 μ L NiCl_2 -Lsg. (50 mM) versetzt und gevortext. Die Suspension wurde für 10 min inkubiert. Nach Zentrifugation wurde das Pellet zweimal mit Wasser gewaschen und in 1000 μ L Wasser aufgenommen. Anschließend wurde die Probe mit der Ultraschallsonde (siehe Kapitel 3.1.1.3) (1 s Schallintervall, 5 s Pausenintervall, 25 % Amplitude, 5 s Gesamtschallzeit) geschallt. Die Suspension wurde für 10 min inkubiert. Nach Zentrifugation wurde das Pellet in 500 μ L Phosphatpuffer (10 mM, pH 7.2) aufgenommen und mit 60 μ L (8 nmol) GFP-Stammlösung (3.93 mg/mL) versetzt. Die Suspension wurde für 60 min inkubiert und danach 1:1 (v/v) gesplittet. Nach Zentrifugation wurden die Proben einmal mit 500 μ L Phosphatpuffer (10 mM, pH 7.2) gewaschen. Eine Probe wurde darauf zweimal mit 500 μ L Phosphatpuffer (7.5 mM, pH 7.2) und die andere zweimal mit 500 μ L Phosphatpuffer (7.5 mM, pH 7.2, 250 mM Imidazol) gewaschen. Zwischen den Waschschrritten wurden die Proben jeweils für 10 min inkubiert. Abschließend wurden beide Proben je zweimal mit 500 μ L Wasser gewaschen und in 250 μ L Wasser aufgenommen.

Zum Nachweis der reversiblen Anbindung wurden die Proben mittels analytischer Dichtegradientenzentrifugation untersucht (siehe Kapitel 3.5.1.2). Hierzu wurden die nach oben angeführter Vorschrift hergestellten Proben auf analytische Standardgradienten gegeben.

Die Abb. 138 zeigt deutlich den Unterschied in der Schwimmdichte zwischen dem Biokonjugat GFP-PM (Probe A) und der durch reversible Bindungsspaltung erzeugten ungebundenen PM (Probe B). Neben der Änderung der makroskopischen Eigenschaften (hier Schwimmdichte), wurde auch durch mikroskopische Untersuchungen die erfolgreiche

reversible Anbindung von GFP an PM nachgewiesen. Im Folgenden wurden die nach oben angeführter Vorschrift hergestellten Proben mittels AFM untersucht (siehe Kapitel 3.7.3).

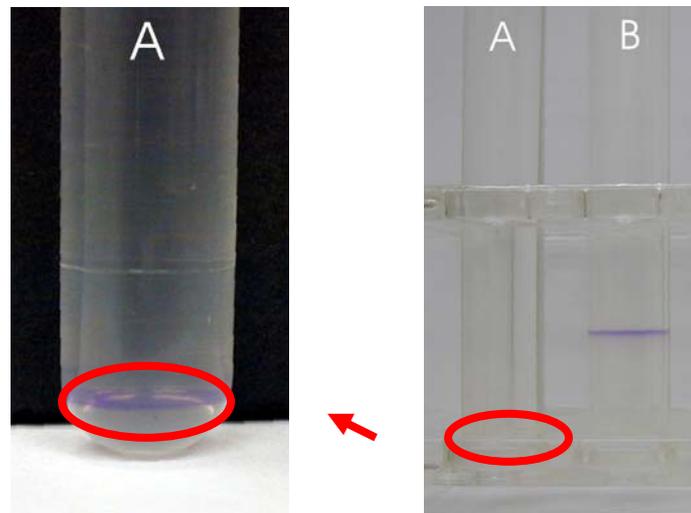


Abb. 138: Bilder der analytischen Zuckergradienten des Biokonjugats NTA-MPOS-D36C + GFP. Probe A: Ohne Imidazol gewaschen. Probe B: Mit Imidazol gewaschen.

In den AFM-Aufnahmen (siehe Abb. 139) zeigt das Biokonjugat GFP-PM (rechts) eine gegenüber der freien PM (links) erhöhte Ausdehnung in der z-Achse, also orthogonal zur Membran. Diese erhöhte Ausdehnung ist auf die Anbindung von GFP an der Membranoberfläche zurückzuführen.

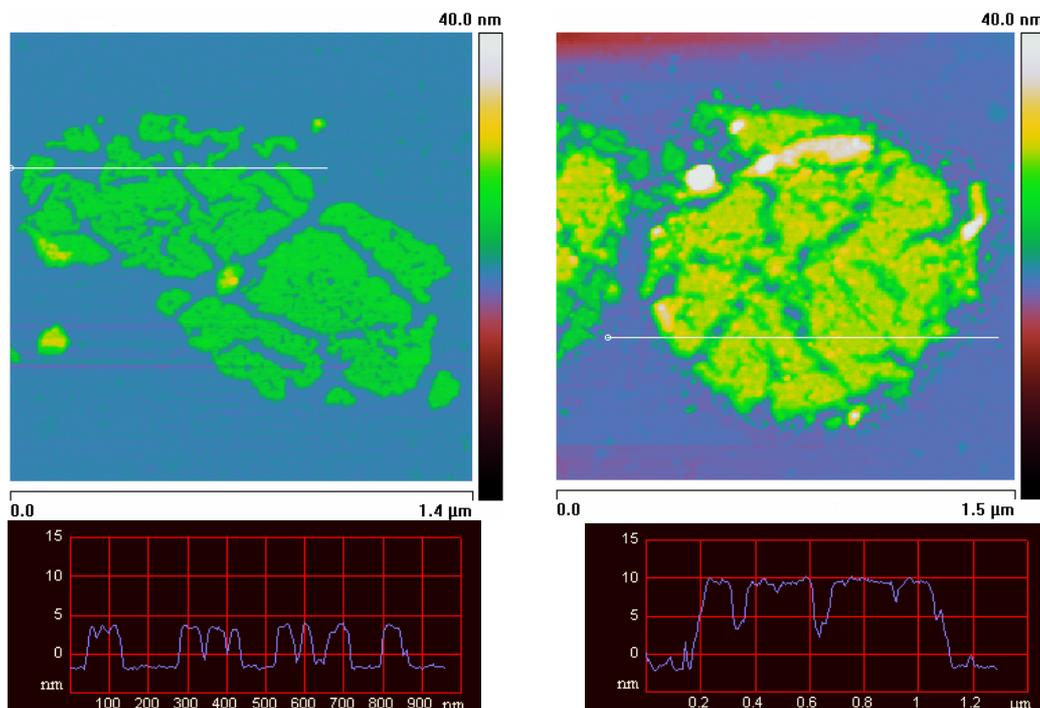


Abb. 139: AFM-Aufnahmen mit Höhenprofil (vgl. weiße Linie) des Biokonjugats NTA-MPOS-D36C + GFP auf Glimmer. Links: Mit Imidazol gewaschen. Rechts: Ohne Imidazol gewaschen.

Zusammenfassend konnte die erfolgreich reversible Anbindung von His-getagtes GFP an NTA-BR durch Änderung der Schwimmdichte und in AFM-Aufnahmen gezeigt werden. Eine unspezifische Anbindung von GFP an der PM kann ausgeschlossen werden, da mit Imidazol gewaschene Proben keine Anbindung von GFP zeigen. Es ist somit von einer spezifischen Bindung über die NTA-His-Wechselwirkung auszugehen.

6.3.6 Zusammenfassung

Im Rahmen der durchgeführten Experimente wurden mit der Massenspektrometrie erfolgreich geeignete Analysemethoden zur Identifizierung von biochemischen Modifikationen an BR etabliert. Mittels ESI-MS können durch Messung des gesamten Proteins Modifikationen am BR schnell und reproduzierbar nachgewiesen werden. Durch BrCN-Spaltung und Trennung mittels HPLC mit anschließender Messung von MS/MS-Spektren können unter Berücksichtigung der sterischen Zugänglichkeit der Aminosäuren die Bindungsstellen der chemischen Modifikation identifiziert werden.

Im Folgenden wurden verschiedener Linkersysteme aus der klassischen Konjugatchemie auf ihre Bindungsfähigkeit und Selektivität der Bindungsposition an BR untersucht. Hierbei zeigte sich eine hohe Selektivität für die NHS-Ester auf die ϵ -Aminogruppe von Lysin-129 und für Maleinimid auf die Thiolgruppe von Cystein-36 für die entsprechende Mutante.

Es wurde diskutiert, dass zur Anbindung nanoskaliger Funktionseinheiten an die mittels Linker seitenspezifisch funktionalisierte PM die klassische Kopplungschemie aufgrund von den Linker deaktivierenden Konkurrenzreaktionen versagt. Somit wurde unter Nutzung der nichtkovalenten NTA-His- und Biotin-Avidin-Bindung geeignete Kopplungssysteme zur Anbindung der Funktionseinheit an den am BR fixierten Linker etabliert. Durch die breite Verfügbarkeit von Biotin-/Avidin-gelabelten bzw. His₆-getagten Systemen, wie z.B. Proteinen, Oligonukleotiden und Nanobeads, erschließt sich über die gewählten Bindungskonzepte ein weites Anwendungsfeld zur Anbindung nanoskaliger Funktionseinheiten an BR. Besonders herauszustellen ist, dass die NTA-His-Bindung trotz hoher Selektivität und Affinität durch Einsatz geeigneter Reagenzien unter Erhalt der Funktionalität der Bindungspartner gespalten werden kann. Somit konnte erstmalig eine "schaltbare Bindung" am BR etabliert werden, die zur reversiblen Anbindung von nanoskaligen Funktionseinheiten verwendet werden kann. Abschließend wurde am Beispiel

der reversiblen Anbindung von His₆-GFP an NTA-gelabeltes BR das Konzept der "schaltbaren Bindung" erfolgreich experimentell nachgewiesen.

7 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue Applikationsfelder von Bakteriorhodopsin erfolgreich erforscht und entwickelt. Im ersten Teil der Arbeit wurden die Konzepte von Bakteriorhodopsin als photochromes Pigment und als optischer Langzeitdatenspeicher stark erweitert und zu einem multifunktionalen Sicherheitskonzept auf Basis von Bakteriorhodopsin vereint. Im zweiten Teil wurden Grundlagen und Konzepte für die Verwendung von Bakteriorhodopsin in Bio-Hybrid- und Hybrid-Bio-Systemen aufgezeigt und entwickelt.

7.1 BR als multifunktionales Sicherheitselement

Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, vereint das BR-Molekül durch die Photochromie und die Möglichkeit zur optischen Datenspeicherung mehrere Funktionen, die in Kombination zu einem multifunktionalen Sicherheitselement führen (siehe Tab. 34).

Tab. 34: Eigenschaften von BR bezogen auf die Applikation als Sicherheitselement.

Eigenschaft	Funktion	Applikation
chemisch / genetisch optimierte Photochromie	schneller Farbwechsel unter Umgebungslicht	- visuell abmusterbares OVD - optoelektronisch prüfbares OVD - optischer Kopierschutz gegen Scanner und Farbkopierer
laserinduzierte Photokonversion	photoinduzierbare permanente Anisotropie	- optischer WORM-Speicher - optische Datenverschlüsselung
genetisch modifizierte nicht-funktionelle Aminosäuresequenz	molekulares Identifikationsmerkmal	- Rückverfolgbarkeit - chemische Modifizierung über Biokonjugate

Neben den bisher im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Funktionen bietet das BR weiterhin die Möglichkeit durch genetische Modifikation nicht-funktioneller Abschnitte der Aminosäuresequenz des Proteins ein molekulares Identifikationsmerkmal einzuführen ohne die Funktion des Moleküls zu verändern. Bei einer Sequenzlänge von 10 Aminosäuren ergeben sich für die 20 verschiedenen Aminosäuren 20^{10} mögliche Codes die im Molekül abgelegt werden können. Durch Sequenzierung, z.B. mittels LC/MS - ein geeignetes Verfahren wurde im Rahmen dieser Arbeit entwickelt - (siehe Kapitel 6.3.2), kann dieser

molekulare Code ausgelesen werden. Somit würde z.B. eine Rückverfolgbarkeit des Materials bis zum Hersteller oder bis hin zu einzelnen Produktionschargen möglich sein. Zusätzlich können auch an geeignet genetisch-modifiziertem BR durch Biokonjugatchemie weitere Funktionen, wie z.B. Fluoreszenzfarben, nanoskalige Magnetpartikel, etc., angehängt werden, um weitere Sicherheitsfunktionen am BR-Pigment einzuführen. Die Biokonjugatchemie von BR wurde im Kapitel Hybrid-Bio-Systeme bearbeitet und verschiedene Methoden zur Anbindung von Funktionseinheiten an PM etabliert (siehe Kapitel 6.3).

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte photochrome Tampondruckfarbe wurde für visuell unter ubiquitären Lichtquellen abmusterbare OVDs optimiert. Anhand der diskutierten Einflussparameter der Photochromie ist es möglich auch Tampondruckfarben zu entwickeln, die bevorzugt für eine optoelektronische Überprüfung des Farbwechsels geeignet sind. Solche OVDs könnten über eine so geringe optische Dichte verfügen, dass sie vom Benutzer nicht wahrnehmbar sind und somit als verdecktes Sicherheitsmerkmal fungieren. Die maschinelle Abtastung könnte mit einfachen optoelektronischen Komponenten erfolgen. Erste Prototypenterminals wurden bereits erfolgreich in der Arbeitsgruppe entwickelt ^[132]. Neben der maschinellen Überprüfung der Photochromie, konnte in den entwickelten Terminals auch das automatisierte Auslesen von im BR-WORM-Speicher eingeschriebenen 2D-Barcodes gezeigt werden.

Wie bereits eingangs in Kapitel 5.1 beschrieben ergibt sich für Sicherheitselemente ein breites Anwendungsgebiet. Der Schutz von Dokumenten (Identity-Cards, Banknoten, etc.) und Produkten (Markenartikel, Medikamente, etc.) ist hierbei von hohem ökonomischen und politischen Interesse.



Abb. 140: Beispiel für eine ID-Card mit mehreren Sicherheitselementen auf BR-Basis. A: Photochromes OVD. B: Optischer WORM-Speicher.

Abb. 140 zeigt als Beispiel eine ID-Card im Standardformat ID1 - Kreditkarten- bzw. Führerscheinformat - mit photochromen OVD und optischem WORM-Speicher auf BR-Basis. Der Datenspeicherbereich kann mit einer Größe von 60 mm x 14 mm bei einer Datendichte von 135 kB/cm² ein mittels One-Time-Pad verschlüsseltes Datenvolumen von 1.1 MB speichern. Eine solche Karte ist besonders interessant für Anwendungen, bei denen größere Datensätze an vertraulichen Informationen gespeichert werden müssen. Denkbar wäre die Anwendung als Zugangskontrollausweis zu schützenswerten Bereichen, wie z.B. Flugbereich, Firmen und Militär. Auch ein Einsatz als Gesundheitskarte wäre möglich. Die Karte könnte dann verschlüsselte Informationen zu Krankheiten, durchgeführten Behandlungen und Allergien tragen.

7.2 BR in Bio-Hybrid- und Hybrid-Bio-Systemen

Im Rahmen der durchgeführten Experimente konnte mit der elektrophoretischen Sedimentation unter Nutzung des Phänomens der Selbstorganisation die Grundlagen zur seitenspezifischen Fixierung von PM-Fragmenten auf Goldsubstraten etabliert werden. Das hier assemblierte Bio-Hybrid-System verfügt über eine naheliegende Anwendung als optoelektronische Komponente. Wie bereits beschrieben (siehe Kapitel 2.4), führt die Absorption eines Photons zu einem gerichteten Protonentransport durch die PM. Das BR fungiert somit als optoelektronischer Signalwandler. Gelingt es, die durch das Photon erzeugte Ladung kurzzeitig zu speichern und über Elektroden abzuleiten, kann BR als biogenes CCD (Charge-Coupled Device) eingesetzt werden. Zum Aufbau von CCD-Arrays auf BR-Basis müssten die Substrate mit Elektrodenarrays aus Goldfeinstleitern versehen werden. Zur Strukturierung von Metalloberflächen stehen eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung - zum einen die klassischen lithographischen Verfahren und neue Techniken, wie z.B. Micro-Contact-Printing (μ CP)^[4]. Als preiswertes und viel versprechendes Verfahren soll an dieser Stelle kurz auf das Micro-Contact-Printing eingegangen werden. Bei dieser Methode wird mittels eines Silikonstempels eine Feinststruktur, die im Bereich von unter einem μ m bis zu mehreren μ m liegen kann, auf das zu strukturierende Substrat übertragen. Die während des Stempelns übertragene "Tinte" besteht u. a. aus sich selbstassemblierenden Molekülen^[214], die eine Schutzschicht auf dem Substrat an den Stellen ausformen, an dem es vom Stempel berührt wird. In einem zweiten Schritt wird dann das Substrat geätzt^[215, 216], wobei die Strukturen zurückbleiben, die mit einer Schutzschicht versehen wurden. In einem dritten Schritt wird die Schutzschicht mittels Elektrooxidation durch Anlegen einer Spannung an der

zu entschützenden Elektrode entfernt. Da die Möglichkeit besteht die Elektroden einzeln zu bonden, können diese auch selektiv entschützt werden. Da nur entschützte Elektroden mit PM belegt werden können, ergibt sich somit die Möglichkeit selektiv verschiedene PM Typen oder andere Nanostruktureinheiten auf separate Elektroden aufzubringen und so komplexe Bio-Hybrid-Systeme zu erzeugen (siehe unten).

Durch seitenspezifische Funktionalisierung von PM-Fragmenten mit NTA und Biotin konnte im Rahmen dieser Arbeit die Grundlagen zum Aufbau von Hybrid-Bio-Systemen auf Basis von BR etabliert werden. Somit können nun Biotin-/Avidin-gelabelte bzw. His₆-getagte nanoskalige Funktionseinheiten, wie z.B. Proteine, Oligonukleotide und Nanobeads, an PM angebunden werden. Durch die Reversibilität der NTA-His-Bindungsknüpfung konnte erstmalig eine "schaltbare Bindung" am BR etabliert werden, die zur reversiblen Anbindung von nanoskaligen Funktionseinheiten verwendet werden kann. Auf Basis des hier entwickelten Konzepts ergibt sich eine Vielzahl von technischen Anwendungsmöglichkeiten für auf PM-basierende Hybrid-Bio-Systemen. Denkbar ist z.B. die Isolierung von His₆-getagten Proteinen aus komplexen Mischung durch Anbindung des getagten Proteins an mit NTA funktionalisierter PM, anschließender Abtrennung mittels Sedimentationszentrifugation und abschließender NTA-His-Bindungsspaltung. Komplexe Hybrid-Bio-Systeme lassen sich durch Anbindung von Enzymen an der PM erzeugen. Die PM dient in diesem Fall als Templat für die als „Nanofabriken“ fungierenden Enzyme. Enzym-Substrat-Reaktionen können dann an der PM-Oberfläche ausgeführt werden. Nach erfolgter Reaktion kann das Enzym-PM-System leicht durch Sedimentationszentrifugation vom Produkt getrennt werden und steht somit für weitere Reaktionen zur Verfügung.

Durch Kombination der im Rahmen der Bio-Hybrid- und Hybrid-Bio-Systemen etablierten Verfahren wird es denkbar hochkomplexe „labs-on-chip“-Systeme auf PM-Basis zu assemblieren. Hierzu sind zunächst die entsprechenden Hybrid-Bio-Systeme, z.B. in Form der oben beschriebenen Enzym-PM-Konjugate zu erzeugen. In einem zweiten Schritt werden diese Systeme dann mittels elektrophoretischer Sedimentation unter Nutzung der Thiol-Gold-WW selektiv und ortsspezifisch auf zuvor z.B. mittels Micro-Contact-Printing (siehe oben) strukturierten Goldsubstraten fixiert. Auf diesen „labs-on-chip“-Systemen könnten auch komplexe mehrstufige Enzymreaktionen durch geeignete Strömungsführung der Reaktanden und Produkte ausgeführt werden.

Die vorliegende Arbeit widmet sich der Erforschung und Entwicklung neuer Applikationen des Membranprotein Bakteriorhodopsin als nanobiologisches Material. Mit den im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Konzepten und entwickelten Methoden wurden Grundlagen zum Transfer des biologischen Systems Bakteriorhodopsin in technische Anwendungen etabliert und neue wissenschaftliche Tätigkeitsfelder erschlossen.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

#-D	#-dimensional
A	optische Anisotropie
ADP	Adenosindiphosphat
AFM	atomic force microscope
ATP	Adenosintriphosphat
av	durschnittliche Molekülmasse
BP	Bandpassfilter
BR	Bakteriorhodopsin
BS	beamsplitter
CCD	charged coupled device
CID	collisionally induced decay
CIE	Commission Internationale de L'Éclairage
CP	cytoplasmatisch
CPM	7-Diethylamino-3-(4'-maleinimidylphenyl)-4-methylcoumarin
CSR	controlled shear rate
CSS	controlled shear stress
CW	continous wave
DCF	Dichroismusfaktor
DMF	Dimethylformamid
EC	extrazelluär
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	electro spray ionisation
HDH	Hochdruckhomogenisator
HPLC	high performance liquid chromatography
HR	Halorhodopsin
KMK	Kritische Micellbildungskonzentration
LHP	Lampdahalbeplatte
LP	linearer Polfilter
M	mirror

MALDI	matrix assisted laser desorption ionisation
mi	monoisotopische Molekülmasse
M_n	Anzahl der Monomereinheiten im Polymer
MS	Massenspektrometrie
M_w	Durchschnittliche Molekulare Masse des Polymers (g/mol)
Nd :YAG	Neodym dotierter Yttriumaluminiumgranatlasers
Nd :YLF	Neodym dotierter Yttriumlithiumfluoridlasers
NOPA	non-collinear optical parametric amplifier
NP	normal-phase
OD	optische Dichte
OD*	optische Dichte in freien Einheiten (arbitray units) aus Reflexionsmessungen
OVD	optically variable device
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PD	Photodiode
PEI	polyethylenimine
PM	Purpurchmembran
PRC	protonrelaese complex
RA	relative optische Anisotropie
RP	reversed-phase
rpm	rounds-per-minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SR	Sensorrhodosin
TFA	Trifluoressigsäure
Tricin	N-[2-Hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)-ethyl]-glycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSG	template stripped gold
USS	Ultraschallsonde
WORM	write-once-read-many
WT	Wildtyp
WW	Wechselwirkung

Aminosäuren wurden entsprechend der IUPAC-Nomenklatur mit Einbuchstabensymbolen abgekürzt.

8.2 Massenspektren

Die Fragmente der MS/MS-Spektren wurden entsprechend der gängigen Konvention benannt [74].

8.2.1 Fragment 7 des BrCN-Verdaus von Fmoc-OSu gelabelten D96N

MS/MS für MH_2^{2+} (1567.95 Da)

Masse / Da	Intensität	MS/MS-Ion	Δ Masse / Da	MS/MS-Ion	Δ Masse / Da	MS/MS-Ion	Δ Masse / Da
501.703247	22068						
512.821289	47514	a ₆	-0.52				
515.326374	44378						
529.05441	40021						
535.741333	34691						
541.445068	19305	b ₆	0.11				
543.175049	34494						
545.225708	145873	y ₆	-0.068				
556.304199	6144						
567.071167	16016						
570.247461	24058	a ₇	-0.11				
577.887207	9084						
586.472656	14676						
588.1073	9658						
598.115234	8007	y ₇ -H ₂ O	-0.2	b ₇	-0.24		
599.324707	22096	b ₇	0.97				
606.560791	64066						
612.351563	39229						
613.776855	15813						
615.469482	13464	y ₇	-0.86				
616.145387	272946	y ₇	-0.19				
617.279053	12275	y ₇	0.95				
622.475952	21410						
628.049072	38373						
635.179688	5855						
637.087402	56154						
651.688418	112931	b ₈ -H ₂ O	0.31				
660.949951	10290						
663.292603	28779						
665.891357	52650						
669.923828	25064	b ₈	0.53				
676.070801	12526						
677.878662	43960						
683.95752	77631						
684.56665	2						

687.509521	136023	$y_{12}\text{-NH}_3^{+2}$	0.31		
691.235107	19966				
693.498657	4968				
702.098633	20881				
709.167603	11043				
717.406006	69389				
722.74707	98288				
723.35498	23				
728.05188	8661				
743.327881	3097				
744.257446	3921				
752.156128	21114				
764.334127	39208	$b_9\text{-H}_2\text{O}$	-0.13		
767.398193	195400				
772.336548	43749				
775.138184	152768				
780.383301	19705				
782.429371	56898	b_9	-0.048		
792.20459	8138				
795.09082	9229				
797.926392	3930				
799.94104	3221				
802.190093	271060	y_8	-0.22		
803.302002	41605	y_8	0.89		
812.128418	64505	$y_{14}\text{-H}_2\text{O}^{+2}$	0.44	$y_{14}\text{-NH}_3^{+2}$	-0.55
815.319824	10772				
823.354004	2470				
826.267334	4489				
826.98877	8324				
838.775391	12763				
841.257813	5207				
845.04541	9638				
851.254639	27653				
866.445435	18270	$b_{10}\text{-H}_2\text{O}$	0.93		
876.558594	34412				
877.918701	14070				
878.904785	16620				
882.358276	72623				
883.264893	6454	b_{10}	-0.26		
887.441528	30735				
905.237793	9036				
916.589844	22517				
917.354126	16105				
923.269043	52161				
931.345459	56940				
932.121826	25227				
936.581421	3388				
938.95459	101795				
954.152832	7365				
955.418783	161906				
956.084106	10				
959.973755	84831				
961.345215	56235				
962.166626	1				

970.353882	8931	$y_9\text{-H}_2\text{O}$	-0.12
980.42334	44148		
981.136719	13516		
982.187134	67234		
987.227417	41925		
988.418958	338175	y_9	-0.07
989.498263	4484		
990.775024	55335		
993.791016	15343		
995.210083	51179		
999.320923	43898		
1000.47412	15394		
1002.31553	47184	$a_{17}\text{-NH}_3^{+2}$	-0.44
1003.57727	22761		
1013.2865	57239		
1014.14783	92186		
1016.72095	66355	$b_{17}\text{-NH}_3^{+2}$	0.38
1023.31335	7500		
1025.34961	6227	b_{17}^{+2}	0.61
1034.27783	58682		
1035.01318	10915		
1037.17114	52161		
1043.06616	25417		
1044.22778	1192		
1049.36206	18571		
1056.36035	6288		
1062.14841	52819		
1069.16626	51220	$y_{10}\text{-H}_2\text{O}$	-0.38
1070.10596	125100	$y_{10}\text{-H}_2\text{O}$	0.56
1073.71164	99183		
1074.35853	61838	b_{18}^{+2}	-0.44
1075.59172	48002		
1082.87988	2281		
1083.48218	8362		
1085.32854	19990		
1087.81885	9278	y_{10}	0.26
1092.44312	26123		
1093.05444	28205		
1096.30127	136509		
1096.94653	3		
1099.01123	174172		
1099.78418	77466		
1100.41968	71911		
1101.21826	8611		
1102.50098	59236		
1103.24121	41286		
1109.14307	122295		
1110.32666	17978		
1110.94751	65249		
1112.11475	23980		
1118.75732	26194	$y_{17}\text{-NH}_3^{+2}$	0.42
1119.4436	13452		
1120.17212	42033		

1121.69385	99248				
1122.29932	24448				
1123.55176	18258				
1124.65674	8224				
1127.99561	11687				
1131.55029	12020				
1133.18058	89268				
1134.17993	68024				
1139.7002	19660				
1148.22192	36437				
1151.08667	8007				
1152.75708	1887				
1153.42188	13244	a_{19}^{+2}	-0.4		
1158.33057	5459	$b_{19}-H_2O^{+2}$	-0.57		
1159.72095	39672				
1160.82129	20297				
1166.96094	149987				
1167.8667	1	b_{19}^{+2}	0.49		
1175.20953	31584				
1180.44678	2318				
1184.88947	83610				
1187.30273	17117				
1188.55095	186551				
1189.22754	30				
1189.96582	62351				
1190.62207	5476				
1193.61768	58167				
1195.71826	31818				
1197.50684	31110				
1198.39307	133941				
1199.08765	22				
1200.74658	130311				
1201.7544	96347				
1203.37695	52960				
1204.11963	95651	a_{11}	-0.83		
1204.8667	1				
1209.35698	17582				
1211.76896	73940				
1215.2424	266208	$b_{11}-H_2O$	-0.44		
1216.0166	2	$b_{11}-H_2O$	0.34	$y_{11}-H_2O$	-0.6
1218.26392	11992				
1218.97461	22321				
1221.27051	4629				
1223.33691	16231				
1224.30518	7929				
1228.5743	63801				
1229.39111	57435				
1230.08625	88299				
1231.06372	64304				
1231.92627	28685				
1233.27588	102019	b_{11}	-0.41		
1234.22315	32842	b_{11}	0.53	y_{11}	-0.4
1236.12012	113521			y_{19}^{+2}	0.19
1236.83472	22				

1239.78957	282212			
1240.49316	3			
1241.50928	96953			
1242.63648	89853			
1244.60913	69150			
1245.64404	2995			
1246.44922	151563	a_{20}^{+2}	-0.43	
1247.20312	58081			
1248.23291	5430			
1249.25732	2987			
1250.12158	58941			
1256.02295	4020			
1259.32496	136963			
1260.43066	96707	$y_{20}\text{-H}_2\text{O}^{+2}$	-0.42	b_{20}^{+2} -0.46
1265.60445	37353			
1271.16113	9684			
1272.02637	90560			
1273.59507	290088	$a_{21}\text{-NH}_3^{+2}$	-0.15	
1274.43026	148545			
1278.46056	114365			
1281.5972	183339			
1282.5835	43002	a_{21}^{+2}	0.8	
1283.71973	121825			
1285.68848	5009			
1287.11467	290996	$b_{21}\text{-H}_2\text{O}^{+2}$	-0.12	
1287.91388	56701	$b_{21}\text{-NH}_3^{+2}$	0.5	
1289.33643	53046	$y_{21}\text{-H}_2\text{O}^{+2}$	0.37	$y_{21}\text{-NH}_3^{+2}$ -0.62
1292.95606	33592			
1293.96777	21451			
1295.93642	243777	b_{21}^{+2}	-0.48	
1296.70654	292855			
1297.32715	38728			
1298.51904	1962	y_{21}^{+2}	0.72	
1304.41846	18739	a_{12}	-0.34	
1305.55225	8377	a_{12}	0.79	
1308.75879	74502			
1310.85303	138282			
1311.49414	6735			
1313.47876	115511			
1314.44669	101140	$b_{12}\text{-H}_2\text{O}$	-0.3	
1315.45654	4144	$b_{12}\text{-H}_2\text{O}$	0.71	
1316.3423	36541			
1317.91943	13895			
1321.66699	183306			
1322.57129	31919			
1323.20215	70057			
1330.52627	61236	$a_{22}\text{-NH}_3^{+2}$	0.63	
1331.39021	276910			
1332.00977	10	b_{12}	-0.75	
1332.84245	19649	b_{12}	0.086	
1335.34666	227370			
1336.0332	8			

1338.12109	10291						
1338.85889	30208	$y_{22}\text{-H}_2\text{O}^{+2}$	0.34	a_{22}^{+2}	0.27	$y_{22}\text{-NH}_3^{+2}$	-0.64
1343.47129	67885	$b_{22}\text{-H}_2\text{O}^{+2}$	-0.49				
1344.03763	135835	$b_{22}\text{-H}_2\text{O}^{+2}$	0.64	$b_{22}\text{-NH}_3^{+2}$	-0.34		
1345.58911	3930						
1348.37817	4469						
1350.35034	69852						
1351.43457	66882						
1352.662	415153	b_{22}^{+2}	-0.12				
1353.99463	57660						
1354.7334	1						
1358.40649	249422						
1359.18067	43976						
1359.97168	69913						
1361.64844	63995						
1363.38341	68724						
1364.36404	48741						
1365.56104	137540						
1366.51318	65609						
1372.5093	136028	$y_{12}\text{-H}_2\text{O}$	-0.21				
1373.30731	45828	$y_{12}\text{-H}_2\text{O}$	0.59	$y_{12}\text{-NH}_3$	-0.39	$a_{23}\text{-NH}_3^{+2}$	-0.84
1375.43701	8963						
1379.33319	192594						
1380.85354	131695						
1381.49097	15						
1383.2981	4244						
1385.45898	78711						
1387.21289	14638	$b_{23}\text{-H}_2\text{O}^{+2}$	-0.037				
1388.04573	273118	$b_{23}\text{-NH}_3^{+2}$	0.64				
1388.55664	51022						
1390.5126	183954	y_{12}	-0.21				
1391.88309	86452						
1392.69165	106465						
1394.49316	62031						
1395.97217	92807	$y_{23}\text{-NH}_3^{+2}$	0.5	b_{23}^{+2}	-0.53		
1397.77246	13986						
1398.75418	82285						
1400.39319	51241						
1401.82227	7599						
1402.82056	21269						
1403.55151	93137						
1404.2666	1	y_{23}^{+2}	0.065				
1405.64356	50004						
1407.34546	13281						
1408.01733	42158						
1411.54639	38793						
1416.6615	57381						
1417.67871	22449						
1419.46436	83316						
1420.44971	88462						
1423.93	104932	$y_{24}\text{-H}_2\text{O}^{+2}$	0.38	$y_{24}\text{-NH}_3^{+2}$	-0.6	$a_{24}\text{-NH}_3^{+2}$	-0.64
1428.70149	254576						
1431.09912	13759						

1431.94646	25393				
1433.87109	7750				
1437.50638	21701	$b_{24}\text{-H}_2\text{O}^{+2}$	-0.5		
1438.8794	26714				
1441.15356	1373				
1441.8208	72706				
1442.32764	25191				
1442.99072	6494				
1446.40338	190623	b_{24}^{+2}	-0.71		
1447.427	7726				
1448.22388	11282				
1451.02309	160380				
1452.36079	223324				
1454.82398	63814				
1455.52393	116385				
1457.80957	67058				
1458.90047	38498				
1459.62915	17595	$a_{25}\text{-NH}_3^{+2}$	-0.28		
1461.44912	86617				
1463.86727	241252				
1464.50606	59097				
1468.03052	35967	a_{13}	0.21	a_{25}^{+2}	-0.5
1470.7967	65985				
1472.11182	90288				
1473.05125	157449	$b_{25}\text{-H}_2\text{O}^{+2}$	-0.44		
1473.8507	4008	$b_{25}\text{-NH}_3^{+2}$	0.17	$y_{25}\text{-H}_2\text{O}^{+2}$	-0.83
1475.21094	39803	$y_{25}\text{-NH}_3^{+2}$	0.91		
1477.4355	172323	$b_{13}\text{-H}_2\text{O}$	-0.37		
1478.29735	10614	$b_{13}\text{-H}_2\text{O}$	0.49		
1479.61694	4382				
1480.66504	3713				
1482.53865	156760	b_{25}^{+2}	0.52		
1484.0791	21364				
1484.75537	2				
1486.61426	36571				
1490.75507	67858				
1492.54175	22151				
1493.83228	26699				
1495.50935	120535	b_{13}	-0.31	$a_{26}\text{-NH}_3^{+2}$	0.45
1496.85156	63564				
1498.4624	527				
1499.24072	34983				
1499.7752	296790				
1500.50928	35505				
1503.64111	28800	$y_{26}\text{-NH}_3^{+2}$	0.75	a_{26}^{+2}	-0.32
1508.57151	616015	$b_{26}\text{-H}_2\text{O}^{+2}$	-0.44		
1509.42822	85530	$b_{26}\text{-NH}_3^{+2}$	0.29		
1516.27148	30607				
1517.68738	658263	b_{26}^{+2}	-0.22		
1518.52816	3307				
1519.1294	20755				
1521.15259	24367				

1524.01416	170449				
1528.25464	6349				
1532.15991	8462				
1533.52564	3337				
1539.2439	9168				
1540.69995	16253				
1543.35791	4268				
1550.23389	13760				
1551.27954	13659				
1552.6521	20746				
1553.43451	76132	y ₁₃	-0.36		
1554.42285	7752	y ₁₃	0.63	a ₁₄	-0.43
1556.59082	2518				
1559.64429	6840				
1568.48462	31634				
1579.66602	27268				

MS/MS für MH₂²⁺ (1568.41Da)

Masse / Da	Intensität	MS/MS-Ion	ΔMasse / Da	MS/MS-Ion	ΔMasse / Da	MS/MS-Ion	ΔMasse / Da
444.070679	47102						
465.917542	47051						
480.158936	38538						
492.960815	13825						
507.989197	18567						
523.487549	7691	b ₆ -H ₂ O	0.16				
526.894043	38272	y ₆ -H ₂ O	-0.39				
528.796143	14779						
533.35437	9183						
539.195679	10393						
540.601318	62462	b ₆	-0.73				
544.448242	11013	y ₆	-0.85				
545.060303	52092	y ₆	-0.23				
556.128662	7813						
557.107788	29442						
567.858887	12446						
573.447266	25076						
577.947754	21643						
589.148682	4286						
593.826172	11384						
598.103516	33701	y ₇ -H ₂ O	-0.22	b ₇	-0.25		
606.116089	9392						
620.101929	40402						
623.09375	10547						
626.253052	5880						
628.163418	54036						
630.040161	14104						
633.291992	26696						
639.968628	24961						
642.219971	44155	a ₈	0.82				
651.145874	8623	b ₈ -H ₂ O	-0.24				
652.368042	57042	b ₈ -H ₂ O	0.99				

653.444336	29867		
656.016968	6136		
665.058594	80271		
666.721924	30910		
670.20459	25204	b_8	0.81
673.199097	18134		
677.184868	44981		
683.281494	28905		
703.094971	42723		
706.378174	15461		
717.11792	46826		
729.358154	19232		
729.933838	23808		
738.315918	19382		
742.949463	13167		
745.870605	18202		
748.496582	28333		
750.155273	22114		
752.341675	15487		
756.158203	41270		
764.436523	49651	b_9 -H ₂ O	-0.031
766.9375	19879		
770.23877	18040		
771.016846	32019		
775.19467	35034		
782.223145	5202	b_9	-0.25
794.449951	16771		
798.182617	23075		
802.160522	92082	y_8	-0.25
803.551147	46605		
815.189819	27409		
816.312111	44639		
818.134766	7301		
826.807983	17021		
839.375488	25892		
848.398315	14217		
849.38916	20428		
851.025635	23273		
863.546509	20160		
865.113525	8742	b_{10} -H ₂ O	-0.4
868.865479	26726		
873.020142	49426		
874.168945	19608		
875.36377	16599		
876.230347	11383		
887.335693	9777		
894.938232	9044		
895.923828	13887		
897.162964	12783		
901.245361	44344		
906.264404	41012		
910.04541	20058		
911.01416	19492		
915.351196	25145		

916.076904	29278		
925.728394	37516		
936.237305	10265		
944.157715	15391		
966.427979	40180		
969.634033	9808	$y_9\text{-H}_2\text{O}$	-0.84
979.422363	12873		
984.139526	24215		
986.662964	36976		
988.231313	197941	y_9	-0.26
989.480328	144703	y_9	0.99
990.523804	7855		
992.66394	5961		
999.033936	53490		
1005.31467	76104		
1013.3449	29850		
1015.79285	67572	$b_{17}\text{-H}_2\text{O}^{+2}$	-0.5
1018.67738	43069		
1019.34143	4824		
1021.39197	33790		
1023.49951	31586		
1026.12222	112653		
1026.93042	3991		
1029.21436	23828		
1037.02051	49131		
1044.00749	55879		
1044.50831	14225		
1045.62524	11983		
1053.77881	12351		
1056.62305	18313		
1059.27588	20754		
1065.35034	114056	$b_{18}\text{-H}_2\text{O}^{+2}$	-0.45
1066.09082	29477	$b_{18}\text{-NH}_3^{+2}$	0.047
1073.82764	22459		
1076.57471	12955		
1078.38306	45227		
1082.84815	23610		
1088.44873	11160	y_{10}	0.89
1090.35449	25222		
1094.57715	63701		
1096.24683	25684		
1099.44377	113815		
1100.59595	228377		
1101.48291	29782		
1109.49146	19505		
1111.06543	9005		
1112.19816	46525		
1112.74854	69163		
1115.32373	2822		
1118.01294	21975	$y_{17}\text{-H}_2\text{O}^{+2}$	-0.089
1119.84522	19663		
1120.4834	9634		
1121.23999	29447		
1123.70044	3582		

1133.31226	29065			
1135.22852	18238			
1136.34326	7121			
1138.11035	69203			
1144.90835	29752			
1145.73291	20152			
1148.54932	38989			
1151.68701	40217			
1157.18359	20102			
1161.04785	29617			
1161.75	2			
1162.46879	25014			
1163.69702	15722			
1166.16016	15876			
1168.29883	9244	$y_{18}-H_2O^{+2}$	-0.56	
1181.48145	9327			
1182.70947	8748			
1183.59302	60493			
1186.14941	7274			
1188.31201	16438			
1189.08154	30880			
1191.60156	57426			
1192.60303	75957			
1194.06592	20700			
1195.14258	31590			
1196.13208	11549			
1197.00342	72524			
1197.83154	18343			
1199.2771	45529			
1202.19986	207337			
1202.81836	18			
1203.60889	24355			
1210.36377	16083			
1214.72485	5206	$b_{11}-H_2O$	-0.95	
1215.55635	76414	$b_{11}-H_2O$	-0.12	
1216.50456	121086	$b_{11}-H_2O$	0.83	$y_{11}-H_2O$ -0.11
1219.93799	26676			
1221.90479	53396			
1223.6224	48277			
1226.16602	26898			
1229.81128	13270			
1230.62305	72570			
1231.8374	57587			
1232.74707	37925	b_{11}	-0.94	
1233.55518	21713	b_{11}	-0.13	
1239.15888	94516			
1239.9458	14453			
1241.26982	62109			
1249.09888	9518			
1251.50428	51928	$b_{20}-H_2O^{+2}$	-0.3	
1252.29443	17868	$b_{20}-NH_3^{+2}$	0.3	
1256.85864	47141			
1258.7544	108485			
1259.62329	54102			

1260.30838	62333	$y_{20}\text{-H}_2\text{O}^{+2}$	-0.67	b_{20}^{+2}	-0.7	
1261.02052	99447	$y_{20}\text{-H}_2\text{O}^{+2}$	0.76	b_{20}^{+2}	0.72	$y_{20}\text{-NH}_3^{+2}$ -0.23
1261.97974	87543					
1265.83147	140021					
1266.5	1					
1269.35596	65044	y_{20}^{+2}	-0.58			
1270.38721	9130					
1272.36865	11748					
1277.68652	29248					
1278.70654	27448					
1279.6604	48070					
1284.60303	15345					
1287.12715	545179	$b_{21}\text{-H}_2\text{O}^{+2}$	-0.092			
1288.0207	107663	$b_{21}\text{-NH}_3^{+2}$	0.71			
1288.97169	26779	$y_{21}\text{-H}_2\text{O}^{+2}$	-0.36			
1294.50309	50164					
1296.35428	401699	b_{21}^{+2}	0.35			
1297.28613	43000					
1298.96851	46364					
1301.39746	9390					
1302.30518	37770					
1304.3208	3157	a_{12}	-0.44			
1306.69043	18197					
1307.45996	77706					
1309.40088	57400					
1310.40283	34109					
1312.35156	24824					
1312.96191	18423					
1313.6665	1					
1314.44477	140271	$b_{12}\text{-H}_2\text{O}$	-0.3			
1315.03972	100868	$b_{12}\text{-H}_2\text{O}$	0.29			
1316.2419	127781					
1316.79981	1					
1318.92285	54456					
1326.11328	27113					
1331.29199	9150					
1332.01221	80256	b_{12}	-0.74			
1332.55717	80419	b_{12}	-0.2			
1333.44287	17577	b_{12}	0.69			
1334.21021	93706					
1334.8794	20291					
1337.01514	24131					
1338.32471	11094	$y_{22}\text{-H}_2\text{O}^{+2}$	-0.72	a_{22}^{+2}	-0.8	
1339.00776	46000	$y_{22}\text{-H}_2\text{O}^{+2}$	0.64	a_{22}^{+2}	0.57	$y_{22}\text{-NH}_3^{+2}$ -0.34
1342.30908	47889					
1343.62953	222116	$b_{22}\text{-H}_2\text{O}^{+2}$	-0.17			
1344.15359	287925	$b_{22}\text{-H}_2\text{O}^{+2}$	0.88	$b_{22}\text{-NH}_3^{+2}$	-0.11	
1344.91943	32					
1348.70459	30690					
1351.94775	24128					
1352.86374	164877	b_{22}^{+2}	0.29			

1353.54933	61951			
1355.18457	8772			
1358.04346	36361			
1358.57825	5203			
1359.45557	5816			
1361.25195	21377			
1362.98853	35229			
1364.20654	8736			
1366.50635	58694			
1369.42676	133066			
1370.21289	10178			
1371.47419	98421			
1372.82275	52486	$y_{12}\text{-H}_2\text{O}$	0.11	$y_{12}\text{-NH}_3$ -0.88
1374.36621	46199	$y_{12}\text{-NH}_3$	0.67	
1378.02295	90214			
1378.87891	15887			
1379.46826	18559			
1381.05249	22080			
1382.50952	66231	a_{23}^{+2}	0.54	
1383.86313	33056			
1385.84326	15650			
1386.8246	68927	$b_{23}\text{-H}_2\text{O}^{+2}$	-0.81	
1388.19174	29487	$b_{23}\text{-NH}_3^{+2}$	0.94	
1389.3186	34902			
1390.56604	312976	y_{12}	-0.16	
1391.58423	12368	y_{12}	0.86	
1392.40479	48969			
1393.38232	47702			
1396.24658	41918	b_{23}^{+2}	0.02	
1398.83252	14006			
1399.48731	19316			
1402.35449	26362			
1406.86011	23306			
1407.80615	32499			
1408.75562	26365			
1409.41162	13195			
1416.24243	42146			
1417.8501	24102			
1420.37988	34183			
1422.44922	6436			
1423.68189	58525	$y_{24}\text{-H}_2\text{O}^{+2}$	-0.12	
1428.83252	138296			
1430.46265	11424			
1432.63232	25071	y_{24}^{+2}	-0.22	a_{24}^{+2} -0.26
1435.11426	64265			
1437.34912	111291	$b_{24}\text{-H}_2\text{O}^{+2}$	-0.81	
1438.3794	28810	$b_{24}\text{-NH}_3^{+2}$	0.26	
1441.39722	106756			
1442.16699	20857			
1443.01387	61041			
1443.7334	5			
1446.62611	48849	b_{24}^{+2}	-0.27	

1449.33203	18063				
1451.56445	49791				
1452.1883	108138				
1452.81665	2				
1454.09619	14666				
1455.0752	108530				
1456.01514	20230				
1456.79981	24671				
1457.49902	70086				
1460.99609	75802				
1464.23604	329769				
1465.17042	43562				
1465.98608	29720				
1468.89819	26627				
1471.91016	47262				
1472.82471	165762	$b_{25}\text{-H}_2\text{O}^{+2}$	-0.9		
1473.36499	132991	$b_{25}\text{-H}_2\text{O}^{+2}$	0.18	$b_{25}\text{-NH}_3^{+2}$	-0.8
1474.02002	9583	$b_{25}\text{-NH}_3^{+2}$	0.51	$y_{25}\text{-H}_2\text{O}^{+2}$	-0.49
1475.65454	8627				
1477.27296	101872	$b_{13}\text{-H}_2\text{O}$	-0.54		
1478.15851	79055	$b_{13}\text{-H}_2\text{O}$	0.35		
1482.22656	69636	b_{25}^{+2}	-0.1		
1482.88705	97060	y_{25}^{+2}	-0.76		
1483.46655	1	y_{25}^{+2}	0.4		
1486.99536	9666				
1488.64819	7948				
1490.68921	20819				
1494.44116	24002				
1495.57522	114236	b_{13}	-0.24		
1496.57079	18834	b_{13}	0.75		
1502.49878	29891	$y_{26}\text{-H}_2\text{O}^{+2}$	-0.55		
1503.39648	3483	$y_{26}\text{-NH}_3^{+2}$	0.26	a_{26}^{+2}	-0.81
1505.61865	10607				
1506.22778	15538				
1508.68067	240385	$b_{26}\text{-H}_2\text{O}^{+2}$	-0.22		
1509.36852	117723	$b_{26}\text{-NH}_3^{+2}$	0.17		
1510.1333	1				
1517.59888	97504	b_{26}^{+2}	-0.4		
1518.37531	26023				
1521.53809	13111				
1523.69588	27233				
1540.59082	10779				
1543.13013	51102				
1553.41498	47047	y_{13}	-0.38		
1554.2041	20927	y_{13}	0.41	a_{14}	-0.65
1554.80169	80470	a_{14}	-0.056		
1558.79053	14958				
1559.96069	376150				
1579.34546	5103				

8.2.2 Fragment 3 des BrCN-Verdaus von CPM gelabelten D36C

MS/MS für MH_2^{2+} (1449.62 Da)

Masse / Da	Intensität	MS/MS-Ion	Δ Masse / Da	MS/MS-Ion	Δ Masse / Da	MS/MS-Ion	Δ Masse / Da
409.370361	3947						
418.753235	17815						
420.977356	67529	y_4	-0.23	a_9^{+3}	0.31		
434.611145	27542						
437.049979	42711						
478.276733	79116						
490.27356	64920						
500.016968	11538						
501.272095	48083						
504.911438	39237						
511.281738	25966						
515.938721	62754	y_5-H_2O	-0.34				
522.84668	17300						
527.94873	22254	$b_{11}-NH_3^{+3}$	0.12				
534.024658	29360	y_5	-0.27				
535.018311	24476	y_5	0.73				
538.080811	18522						
540.081299	13360						
546.753941	67546						
557.213379	23867	b_{12}^{+3}	-0.15				
565.000488	109397						
565.599365	3800						
567.223877	13656	a_8^{+2}	0.93				
571.369507	37009	$b_8-H_2O^{+2}$	-0.77				
572.133301	1	$b_8-H_2O^{+2}$	0.76	$b_8-NH_3^{+2}$	-0.22		
575.267944	4978						
575.880981	15989						
579.118652	29441						
581.869019	16506						
589.362549	13171	$b_{13}-NH_3^{+3}$	0.24				
592.932498	67909						
594.47522	36359						
599.237305	8028						
600.029541	75581						
602.316109	29784						
608.840332	36312						
615.303467	5747						
621.113525	7489						
622.251953	7027						
632.038818	90210						
637.209473	28853						
654.306152	18554						
656.963379	16842	$b_{15}-NH_3^{+3}$	0.95				
662.855835	45166						
677.232422	107430						
682.163818	45438						

684.229986	459215	y_7 -H ₂ O	-0.14				
685.557983	10242						
686.601074	10879						
690.444336	7410	a_{16}^{+3}	-0.72				
702.195491	432880	y_7	-0.19				
702.941895	18091	y_7	0.56				
708.080811	24262						
708.800049	47338						
712.33667	14426						
717.014648	32856						
718.101318	19093	b_{10}^{+2}	-0.48				
725.348022	4004						
725.988037	24403						
731.010376	89213	b_4 -H ₂ O	-0.28				
733.127441	49696	b_{17}^{+3}	0.26				
734.136335	70870						
735.227661	49970						
736.13916	29701						
746.199951	20454						
749.171387	64937	b_4	-0.13				
750.144531	10625	b_4	0.85				
751.263062	8288						
757.020874	17010						
762.477783	60091						
763.087402	20232						
772.540771	17048						
778.083252	6112						
783.248047	175621	y_8 -H ₂ O	-0.19	b_{19} -H ₂ O ⁺³	0.54	b_{19} -NH ₃ ⁺³	-0.44
783.866699	2	y_8 -H ₂ O	0.43				
788.084229	12027						
789.922241	37169						
800.298584	30185	b_{11}^{+2}	0.85				
801.092386	219565	y_8	-0.36				
802.143311	15666	y_8	0.69				
805.113281	15857						
805.821289	17423						
814.965088	68308						
817.08868	37506						
819.182983	59452	a_5	0.83				
822.617676	15999						
831.4804	64984						
836.46167	21314						
844.254883	110353	b_{21} -H ₂ O ⁺³	-0.56				
846.409424	15880	b_5	0.06				
850.221924	28366	b_{21}^{+3}	-0.67				
851.455933	60977						
852.320313	3906						
865.423584	15768						
873.003662	27244						
876.061115	73361						
876.68335	2						

878.239284	68825	a_{13}^{+2}	0.61			
880.20752	25573	$y_{21}\text{-NH}_3^{+3}$	0.28			
891.599121	29078	b_{13}^{+2}	-0.67			
893.500366	11533	$b_{22}\text{-H}_2\text{O}^{+3}$	0.11	$b_{22}\text{-NH}_3^{+3}$	-0.87	
896.445313	34334	$y_9\text{-H}_2\text{O}$	-0.079			
897.548706	8906					
903.756592	62989					
911.83728	32354					
914.228149	24433	y_9	-0.31			
915.413208	31360	y_9	0.88			
918.69397	110597					
919.375366	10					
920.023315	12717					
920.902222	13893					
921.749146	4901					
941.686279	153643	$y_{23}\text{-H}_2\text{O}^{+3}$	-0.4			
942.361816	4	b_{14}^{+2}	-0.19	$y_{23}\text{-NH}_3^{+3}$	0.64	
946.059692	26962					
948.508057	105883					
953.292603	40119					
954.373535	25299					
959.294312	54852					
960.917372	150507	b_6	-0.46	$y_{18}\text{-H}_2\text{O}^{+2}$	0.73	$y_{18}\text{-NH}_3^{+2}$
961.599976	1	b_6	0.22			-0.26
971.103516	93822					
971.985474	16485					
977.346313	58635					
978.640625	29629	a_{15}^{+2}	-0.68			
979.43811	13708	a_{15}^{+2}	0.91			
987.127063	50857					
988.113892	24068					
990.576782	36811					
998.750366	66779					
1001.98792	10879					
1007.20422	14712					
1015.40051	3037	$b_7\text{-H}_2\text{O}$	1	y_{10}	-0.18	
1019.56726	5136					
1020.89319	44297					
1021.53333	1					
1026.7627	44703	y_{19}^{+2}	-0.62			
1032.38152	37748	b_7	-0.032			
1037.12549	30962					
1038.42871	14004					
1042.4135	84400					
1048.98975	17519					
1049.71777	118725	b_{16}^{+2}	0.39			
1050.3667	1					
1059.89697	42690					
1062.45215	25910					
1064.27368	124980					
1067.12842	15381	$y_{20}\text{-NH}_3^{+2}$	0.085			

1067.92505	10284				
1077.97559	88947				
1081.41318	53715				
1088.60132	6192				
1089.67486	63253	$b_{17}\text{-H}_2\text{O}^{+2}$	-0.75		
1090.27954	21	$b_{17}\text{-H}_2\text{O}^{+2}$	0.46	$b_{17}\text{-NH}_3^{+2}$	-0.53
1097.8894	45784	$y_{11}\text{-H}_2\text{O}$	-0.73		
1099.17609	254932	$y_{11}\text{-H}_2\text{O}$	0.56	b_{17}^{+2}	0.24
1099.79981	1				
1101.98706	18454				
1102.69409	35404				
1103.41284	28501				
1105.46411	7622				
1109.24951	18797				
1113.86841	7694				
1117.72107	62998				
1120.95947	82886				
1123.58008	17723				
1124.29541	173567				
1127.73779	9918				
1134.69971	18457				
1135.28052	12394				
1136.42969	33586				
1137.40967	35645				
1139.23256	37149	$b_{18}\text{-NH}_3^{+2}$	0.33		
1140.59961	8738				
1141.35742	34480				
1145.26953	43834				
1147.70996	22557	b_{18}^{+2}	0.25		
1159.14404	13752				
1163.24561	16985				
1167.38037	76468				
1169.35205	136309	a_{19}^{+2}	0.5		
1170.22412	36008				
1171.05664	23388				
1172.44678	32073				
1182.69287	32835	b_{19}^{+2}	-0.82		
1184.19531	17797				
1187.51123	55676				
1189.90527	66398				
1190.5874	8				
1191.1001	23332				
1199.71948	41169				
1207.24609	88186				
1209.98096	7194				
1212.08203	12456	$y_{12}\text{-H}_2\text{O}$	0.38		
1216.40625	14009				
1217.604	9684				
1222.73096	36206				
1226.01685	62958	a_{20}^{+2}	0.74		
1229.23389	4502	y_{12}	-0.48		
1230.71666	223315	$b_{20}\text{-H}_2\text{O}^{+2}$	0.16	$b_{20}\text{-NH}_3^{+2}$	-0.83

1231.44873	8	$b_{20}\text{-NH}_3^{+2}$	0.64		
1233.37581	73518				
1236.50584	129426				
1237.35987	75819				
1238.3418	97580				
1239.61937	141458	b_{20}^{+2}	-0.047		
1240.0145	39005	b_{20}^{+2}	0.74		
1250.64648	33128				
1252.72412	36757				
1253.41016	6644				
1257.45313	70227				
1259.33521	43407				
1263.53369	7776				
1264.60791	14762				
1266.38037	6441	$b_{21}\text{-H}_2\text{O}^{+2}$	0.45	$b_{21}\text{-NH}_3^{+2}$	-0.54
1270.26416	12415	$b_9\text{-H}_2\text{O}$	-0.33		
1270.99219	4932	$b_9\text{-H}_2\text{O}$	0.4	$b_9\text{-NH}_3$	-0.58
1271.96777	29435	$b_9\text{-NH}_3$	0.39		
1273.05029	55745				
1274.97168	107538	b_{21}^{+2}	-0.38		
1275.58887	100338	b_{21}^{+2}	0.85		
1276.30664	8				
1277.27759	122932				
1278.06763	25558				
1279.33154	11291				
1287.99584	72661	b_9	-0.61		
1289.76123	27071				
1290.3894	102438				
1291.0332	1				
1306.6311	21000				
1315.41895	33128				
1330.93115	27349				
1331.45068	24331				
1339.14795	4672				
1348.64542	112933	b_{22}^{+2}	-0.1		
1349.31567	11123				
1350.94531	20919				
1357.70264	187257	$b_{22}+\text{H}_2\text{O}^{+2}$	0.003		
1362.7404	186460	$y_{22}\text{-H}_2\text{O}^{+2}$	0.094	$y_{22}\text{-NH}_3^{+2}$	-0.89
1368.53735	40206				
1377.69116	37869				
1385.20557	7562	a_{23}^{+2}	-0.033		
1397.30249	36797				
1399.53809	10714	b_{23}^{+2}	0.64		
1400.25879	12493				
1401.10889	19114				
1404.16626	49290				
1405.69653	2639				
1406.49756	123285				
1407.99268	33071	a_{10}	0.32	$b_{23}+\text{H}_2\text{O}^{+2}$	-0.46
1413.27612	19755				
1418.38839	45044	$b_{10}\text{-H}_2\text{O}$	0.73	$b_{10}\text{-NH}_3$	-0.26

1419.2124	10888	$b_{10}\text{-NH}_3$	0.57
1421.29712	11701	y_{23}^{+2}	0.13
1426.91511	56016		
1430.60523	15719		
1432.42529	47867		
1435.33569	38541	b_{10}	-0.34
1440.67773	1418389		
1441.68311	23514		
1443.27246	6		
1449.70215	22217		
1457.1853	36699		

MS/MS für MH_3^{3+} (967.03 Da)

Masse / Da	Intensität	MS/MS-Ion	Δ Masse / Da	MS/MS-Ion	Δ Masse / Da	MS/MS-Ion	Δ Masse / Da
311.661987	667						
327.536377	2016						
366.293091	1881						
368.071411	281						
379.924561	246						
382.741699	1918						
394.289917	2172						
399.053467	4018						
412.179199	5073						
424.409912	546	$b_9\text{-H}_2\text{O}^{+3}$	0.62	$b_9\text{-NH}_3^{+3}$	-0.36		
467.177368	3931						
469.439209	978						
472.047119	4675						
481.18563	5156						
486.215454	3199						
498.893765	12515						
499.54303	1878						
500.723511	4976						
515.178589	1628						
521.746582	1379						
527.283203	491	$b_{11}\text{-H}_2\text{O}^{+3}$	-0.89				
540.100098	1069						
550.8738	5438						
556.286255	1340						
576.563843	1650						
585.154541	2900						
592.688354	706						
594.903076	1242	b_{13}^{+3}	-0.16				
602.026855	490						
602.583496	1215						
626.227905	485						
662.376465	1733	b_{15}^{+3}	0.16				
684.102539	3520	$y_7\text{-H}_2\text{O}$	-0.27				
700.894531	1015						
702.046631	1013	y_7	-0.34				
711.312012	549	$y_{20}\text{-H}_2\text{O}^{+3}$	-0.26				

718.397217	3145	b_{10}^{+2}	0.11			
721.596069	762	a_4	0.29			
742.646851	2575					
751.453857	1119					
766.606445	306					
774.294556	1784					
776.496094	458					
793.681641	3662					
809.274902	2531					
810.701782	6828					
812.258667	1428					
815.186035	7256					
818.81958	389	a_5	0.46			
821.159668	2102	a_{12}^{+2}	-0.47	$b_{20}\text{-NH}_3^{+3}$	0.21	
823.017822	197					
832.922363	446					
836.432251	508					
837.102905	282					
843.894531	236					
846.25647	434	b_5	-0.093			
847.275024	1232	b_5	0.93			
854.508545	726					
856.502197	817					
857.498291	1218					
864.267796	3193					
865.865356	1396					
872.04541	4972					
875.465088	2144					
881.490041	4598					
885.005493	3001					
893.018517	4682					
895.065366	2409					
901.707886	2395					
905.212617	5355	$b_{22}\text{-H}_2\text{O}^{+3}$	-0.77			
906.047241	2951					
914.016229	10213	y_9	-0.52			
915.467773	1173	y_9	0.93			
924.065918	7975	a_{23}^{+3}	0.75			
926.284424	20439					
926.924927	2	$b_{23}\text{-H}_2\text{O}^{+3}$	-0.66			
927.601074	4386	$b_{23}\text{-NH}_3^{+3}$	0.38			
930.407837	575					
933.737427	538	a_6	0.36	$b_{14}\text{-H}_2\text{O}^{+2}$	0.57	$b_{14}\text{-NH}_3^{+2}$
934.487305	290	y_{17}^{+2}	0.89			-0.41
935.66333	3063					
936.478269	5367					
937.681844	11526					
938.650391	385					
940.762939	8609					
941.697388	4875	$y_{23}\text{-H}_2\text{O}^{+3}$	-0.37			
944.150879	544	$b_6\text{-H}_2\text{O}$	0.78			
944.805786	912					

946.918701	560		
948.104614	635	y_{23}^{+3}	0.84
948.655762	483		
949.342529	2458		
950.359131	509		
952.339029	2644		
956.000366	1390		
959.043579	5477		
966.252075	507		
973.650391	349		

8.3 Danksagung

An dieser Stelle danke ich allen, die mich im Laufe dieser Arbeit unterstützt und damit zu ihrem Gelingen beigetragen haben. Mein Dank gilt,

meinen Eltern für ihre Liebe und stetige Unterstützung.

Prof. Dr. N. Hampp für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die interessante Themenstellung und seinen Einsatz für die Forschungsprojekte.

Prof. Dr. A. Greiner für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

der gesamten Arbeitsgruppe für die schöne Zeit, die heitere Arbeitsatmosphäre und Unterstützung.

meiner Laborantin Carmen "Fußballgott" Preisig weil sie es auch chemisch immer geschafft hat das Runde ins Eckige zu bringen.

Dr. Martin "McGiver" Neebe, der es immer wieder schafft das Unmögliche möglich zu machen. Danke für die fruchtbaren Diskussionen und deine Hilfsbereitschaft.

dem Racingteam Nina Schromczyk für die rasante Filmherstellung und die Unterstützung bei zahlreichen Experimenten.

Dr. Thorsten Juchem für die Einführung ins Strahlenbiegen und die geistigen Gespräche am Abend, die mir manchmal noch am Tag darauf durch den Kopf gingen.

Dr. Frank Noll, der als elektronischer Bücherwurm mir so manche Literaturstelle beschafft hat.

Andreas Schönafinger für die Unterstützung am teuersten Plattenspieler der Welt.

den betreuten Diplomanden Kai Schwartz, Anja Gräßlin und Sabine Kümpel für die Vertiefung der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse und das freundschaftliche Arbeitsverhältnis.

der Auszubildenden Jasmin Heinzer und den zahlreichen studentischen Praktikanten und Hilfskräften, hier besonders Sabine Kümpel, für das gezeigte Interesse und die gewissenhafte Durchführung mancher monotonen Messung.

Dr. Klaus Book, der als Bildungsbürger dafür sorgte, dass in der Arbeitsgruppe neben der Chemie die schönen Künste nie verkümmerten.

Dr. Uwe Linne für die Durchführung der massenspektrometrischen Messungen am QStar.

Dr. A. Schaper und M. Hellwig für die Aufnahme von REM-Bildern.

den Mitarbeitern der Feinmechanik- und Elektronikwerkstatt für ihre Hilfe.

den Kooperationspartnern in Industrie und Forschung und dem BMBF für die finanzielle Unterstützung.

8.4 Literaturstellen

- [1] N. D. Kondratieff, *Die langen Wellen der Konjunktur*, Vol. 56, J.C.B. Mohr, Tübingen, **1926**.
- [2] Unbekannt, Catch the wave. *The Economist* **1999**, 18.02.1999.
- [3] Unbekannt, Beyond Borders. *The Global Biotechnology Report* **2003**.
- [4] M. Köhler, *Nanotechnologie - Eine Einführung in die Nanostrukturtechnik.*, Wiley-VCH, Weinheim, **2001**.
- [5] N. A. Hampp, Bacteriorhodopsin: Mutating a biomaterial into an optoelectronic material. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2000**, 53, 633-639.
- [6] R. R. Birge, Photophysics and molecular electronic applications of the rhodopsins. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1990**, 41, 683-733.
- [7] U. Haupts, J. Tittor, D. Oesterhelt, Closing in on bacteriorhodopsin: Progress in understanding the molecule. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1999**, 28, 367-399.
- [8] N. Hampp, Bacteriorhodopsin as a photochromic retinal protein for optical memories. *Chem. Rev.* **2000**, 100, 1755-1776.
- [9] N. Hampp, D. Oesterhelt, *Bacteriorhodopsin and its potential in technical applications*, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.
- [10] M. Sanio, Optische Methoden der Informationsspeicherung unter Verwendung des biologischen Photochroms Bakteriorhodopsin. Dissertation, Philipps-Universität Marburg **2000**.
- [11] Hochacka, Somero, *Strategien biochemischer Anpassung.*, Thieme, Stuttgart, **1980**.
- [12] Unbekannt, **2005**.
- [13] G. Wagner, Halobakterien: Vordringen in Biotische Grenzbereiche. **1979**, *Biol. Unserer Zeit*, 171.
- [14] W. D. Grant, H. Larsen, *Bergey's manual of systematic bacteriology.*, **1989**.
- [15] C. R. Woese, Archaeobakterien. *Sci. Am.* **1981**, 244, 94.
- [16] W. A. Havelka, R. Henderson, D. Oesterhelt, Three-dimensional structure of halorhodopsin at 7 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **1995**, 247, 726-738.
- [17] D. Oesterhelt, Structure and function of halorhodopsin. *Israel J. Chem.* **1995**, 35, 475-494.
- [18] W. Zhang, A. Brooun, M. M. Mueller, M. Alam, The primary structures of the archaeon halobacterium salinarium blue light receptor sensory rhodopsin II and its transducer, a methyl-accepting protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, 93, 8230-8235.
- [19] K. J. Hellingwerf, W. D. Hoff, W. Crielaard, Photobiology of microorganisms: How photosensors catch a photon to initialize signalling. *Mol. Microbiol.* **1996**, 21, 683-693.
- [20] W. Marwan, D. Oesterhelt, Biochemische Mechanismen einer einfachen Verhaltensreaktion. *Chem. unserer Zeit* **1999**, 33, 140-151.
- [21] D. L. Worcester, R. G. Miller, P. J. Bryant, Atomic force microscopy of purple membranes. *J. Microsc.* **1988**, 152, 817-821.
- [22] R. Henderson, P. N. T. Unwin, Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy. *Nature* **1975**, 257, 28-32.
- [23] A. E. Blaurock, W. Stoeckenius, Structure of the purple membrane. *Nature, New Biol.* **1971**, 233, 152-155.
- [24] L. O. Essen, R. Siegert, W. D. Lehmann, D. Oesterhelt, Lipid patches in membrane protein oligomers: Crystal structure of bacteriorhodopsin bases on high-resolution electron cryomicroscopy. *J. Mol. Bio.* **1990**, 213, 899-929.

- [25] A. Corcelli, V. Lattanzio, G. Mascolo, P. Papadia, F. Fanizzi, Lipid-protein stoichiometries in a crystalline biological membrane: NMR-quantitative analysis of the lipid extract of the purple membrane. *Journal of Lipid Research* **2002**, *43*, 132-140.
- [26] I. Koltover, J. Raedler, T. Salditt, K. Rothschild, C. Safinya, Phase behaviour and interaction of the membrane-protein bacteriorhodopsin. *Physical Review Letters* **1992**, *82*, 3184-3187.
- [27] R. Henderson, J. Baldwin, T. Ceska, F. Zemlin, E. Beckmann, K. Downing, Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *J. Mol. Biol.* **1990**, *213*, 899-929.
- [28] D. Oesterhelt, W. Stoeckenius, Halobacterium halobium and its fractionation into red and purple membrane. *Methods of Enzymology* **1974**, *31*, 667-678.
- [29] B. S. H. Luecke, H. T. Richter, J. P. Cartailler, J. K. Lanyi, Structural changes in bacteriorhodopsin during ion transport at 2 Angstrom resolution *Science* **1999**, *286*, 255.
- [30] E. Gouaux, It's not just a phase: Crystallization and X-ray structure determination of bacteriorhodopsin in lipidic cubic phases. *Structure* **1998**, *6*, 5-10.
- [31] H. Luecke, H. T. Richter, J. K. Lanyi, Proton transfer pathways in bacteriorhodopsin at 2.3 angstrom resolution. *Science* **1998**, *280*, 1934-1937.
- [32] D. Oesterhelt, C. Bräuchle, N. Hampp, Bacteriorhodopsin: A biological material for information processing. *Q. Rev. Biophys.* **1991**, *24*, 425-478.
- [33] H. Houjou, Y. Inoue, M. Sakurai, Physical origin of the opsin shift of bacteriorhodopsin. Comprehensive analysis based on medium effect theory of absorption spectra. *120* **1998**, 4459-4470.
- [34] Y. A. Lazarev, E. L. Terpugov, Effect of water on the structure of bacteriorhodopsin and photochemical processes in purple membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1980**, *590*, 324-338.
- [35] G. Varo, J. K. Lanyi, Pathways of the rise and decay of the M photointermediate(s) of bacteriorhodopsin. *Biochemistry* **1990**, *29*, 2241-2250.
- [36] S. O. Smith, A. B. Myers, J. A. Pardo, C. Winkel, P. P. J. Mulder, J. Lugtenburg, R. Mathies, Determination of retinal Schiff base configuration in bacteriorhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 2055-2059.
- [37] J. Hofrichter, E. R. Henry, R. H. Lozier, Photocycles of bacteriorhodopsin in light- and dark-adapted purple membrane. Studies by time-resolved absorption spectroscopy. *Biophys. J.* **1989**, *56*, 695-706.
- [38] M. Braiman, R. Mathies, Resonance Raman spectra of bacteriorhodopsin's primary photoproduct: Evidence for a distorted 13-cis retinal chromophore. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, *79*, 403-407.
- [39] J. G. Hu, B. Q. Sun, M. Bizounok, M. E. Hatcher, J. C. Lansing, J. Raap, P. J. E. Verdegem, J. Lugtenburg, R. G. Griffin, J. Herzfeld, Early and late M intermediates in the bacteriorhodopsin photocycle: A solid-state NMR study. *Biochemistry* **1998**, *37*, 8088-8096.
- [40] S. Subramaniam, R. Henderson, Crystallographic analysis of protein conformational changes in the bacteriorhodopsin photocycle. *Biochimica et Biophysica Acta* **2000**, *1460*, 157-165.
- [41] H. Sass, G. Büldt, R. Gessenich, D. Hehn, D. Neff, R. Schlesinger, J. Berendzen, P. Ormos, Structural alterations for proton translocation in the M state of wild-type bacteriorhodopsin. *Nature* **2000**, *406*, 649-652.
- [42] S. Balashov, Photoreactions of the photointermediates of bacteriorhodopsin. *Israel Journal of Chemistry* **1995**, *35*, 415-428.

- [43] J. Lanyi, G. Varo, The photocycles of bacteriorhodopsin. *Israel Journal of Chemistry* **1995**, 35, 365-385.
- [44] A. Miller, D. Oesterhelt, Kinetic optimisation of bacteriorhodopsin by aspartic acid 96 as an internal proton donor. *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, 1020, 57-64.
- [45] S. Kushwaha, M. Kates, W. Martin, Charakterization and composition of the purple and red membrane from Halobacterium cutirubum. *Can. J. Biochem.* **1975**, 53, 284-292.
- [46] U. T. Rüegg, J. Rüdinger, Reductive cleavage of cystine disulfides with tributylphosphine. *Methods Encymol.* **1977**, 47, 111-116.
- [47] P. Hufnagel, Makroskopische Bakteriorhodopsin-Präparate: Modifikation, Orientierung, Fixierung. Dissertation, LMU München (München), **1997**.
- [48] R. Pasternack, H. P. Laurent, T. Rüth, A. Kaiser, N. Schön, H. L. Fuchsbauer, A fluorescent substrate of transglutaminase for detection and characterization of glutamine acceptor compounds *Anal. Biochem.* **1997**, 249, 54-60.
- [49] F. Schneider, Enzymatische Quervernetzung membranintegrierten Bakteriorhodopsins. Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg (Marburg), **2000**.
- [50] L. Lorand, L. K. Campbell, Transamidating enzymes. I. Rapid chromatographic assays. *Anal. Biochem.* **1971**, 76, 207-220.
- [51] Unbekannt, *Mowiol Polyvinylalkohol.*, Hoechst, **1991**.
- [52] M. Neebe, Bakteriorhodopsin als multifunktionales photochromes Farbpigment für die Sicherheitstechnik. Dissertation, Philipps-Universität Marburg (Marburg), **2003**.
- [53] U. Zorll, *Römpp Lexikon: Lacke und Druckfarben.*, Thieme, Stuttgart, **1998**.
- [54] A. J. Kinloch, The science of adhesion *Journal of Material Science* **1980**, 15, 2141-2166.
- [55] U. Reinhardt, Rotationsrheometrie - ein Blick in Zukunft. *Applied Rheology* **1997**, 2, 25.
- [56] Unbekannt, *Rheologie und Rheometrie für Anwender.*, Euro Physics GmbH.
- [57] T. Mezger, *Das Rheologie-Handbuch: Für Anwender von Rotations- und Oszillations-Rheometern.*, Vincentz, Hannover, **2000**.
- [58] A. Berger-Schunn, *Praktische Farbmessung.*, Muster-Schmidt, Göttingen, Zürich, **1994**.
- [59] Unbekannt, *DIN 5035.*, Deutsches Institut für Normung, Berlin - Köln, **1988-2004**.
- [60] Unbekannt, *Die Sprache der Farben.*, X-Rite GmbH, Köln, **2000**.
- [61] Unbekannt, *ASTM E308-01 - Standard practice for computing the colors of objects by using the CIE system.*, **2001**.
- [62] Unbekannt, *DIN 1983-08*, 54003.
- [63] P. Wagner, M. Hegner, H.-J. Guentherodt, G. Semenza, Formation and in situ modification of monolayers chemisorbed on ultraflat template-stripped gold surfaces. *Langmuir* **1995**, 11, 3867-3875.
- [64] J. Diebel, H. Löwe, P. Samori, Fabrication of large-scale ultra-smooth metal surfaces by replica technique. **2001**, 73, 273-279.
- [65] M. Hegener, P. Wagner, G. Semenza, Ultralarge atomically flat template-stripped Au surfaces for scanning probe microscopy. *Surface Science* **1993**, 291, 39-46.
- [66] R. Winter, F. Noll, *Methoden der biophysikalischen Chemie.*, Teubner, **1998**.
- [67] F. Lottspeich, H. Zorbas, *Bioanalytik.*, Spektrum, Heidelberg/Berlin, **1998**.
- [68] D. A. Skoog, J. J. Leary, *Instrumentelle Analytik.*, Springer, Heidelberg/Berlin, **1996**.
- [69] R. H. Müller, R. Schuhmann, *Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis.*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, **1996**.
- [70] G. Varo, J. K. Lanyi, Distortions in the photocycle of bacteriorhodopsin at moderate dehydration. *Biophys. J.* **1991**, 59, 313-322.

- [71] T. R. Covey, R. F. Bronner, B. I. Shushan, J. Henion, The determination of protein, oligonucleotide and peptide molecular weight by ion-spray mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* **1988**, *2*, 249-256.
- [72] M. Mann, C. K. Meng, J. B. Fenn, Interpreting mass spectra of multiply charged ions. *Analytical Chemistry* **1989**, *61*, 1702-1708.
- [73] K. Biemann, Sequencing of peptides by tandem mass spectrometry and high-energy collision-induced dissociation. *Methods Encymol.* **1990**, *193*, 455-479.
- [74] K. Biemann, Nomenclature for peptide fragment ions (positive ions). *Methods Encymol.* **1990**, *193*, 886-887.
- [75] K. R. Clauser, P. R. Baker, A. L. Burlingame, Role of accurate mass measurement (+/- 10 ppm) in protein identification strategies employing MS or MS/MS and database searching. *Analytical Chemistry* **1999**, *71*, 2871-2872.
- [76] T. Fischer, Mikroverkapselung von Bakteriorhodopsin. Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg (Marburg), **2001**.
- [77] S. Mitaku, K. Ikuta, H. Itoh, R. Kataoka, M. Naka, M. Yamada, M. Suwa, Denaturation of bacteriorhodopsin by organic solvents. *Biophys. Chem.* **1988**, *30*, 69-79.
- [78] M. Eisenbach, S. R. Caplan, Interaction of purple membrane with solvents: II. Mode of interaction. *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, *554*, 281-292.
- [79] M. Eisenbach, S. R. Caplan, G. Tanny, Interaction of purple membrane with solvents: I. Applicability of solubility parameter mapping. *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, *554*, 269-280.
- [80] E. A. Grulke, *Solubility parameter values.*, Wiley Interscience, **1999**.
- [81] Y. Shen, C. Safinya, K. Liang, A. Ruppert, K. Rothschild, Stabilization of the membrane protein bacteriorhodopsin to 140 °C in two-dimensional films. *Nature* **1993**, *366*, 94-106.
- [82] C. Corporation, *Coulter N4 Plus Submicron Particle Sizer reference manual*, Miami, **1995**.
- [83] Coulter-Corporation, *Coulter N4 Plus Submicron Particle Sizer reference manual*, Miami, **1995**.
- [84] Unbekannt, *Brand Protection.*, Leonard Kurz GmbH & Co. KG, Führt.
- [85] R. L. v. Renesse, *Optical document security.*, Artech House, Boston, **1998**.
- [86] K. W. Bender, Der Euro wird immer häufiger und immer besser gefälscht. Löst der Euro den Dollar als Lieblingswährung der Geldfälscher ab? *FAZ* **2004**.
- [87] H. G. Heller, S. N. Oliver, J. Whittall, I. Tomlinson, Photochromic spiropyran compounds. *Patent U.K. 2 190 379* **1987**.
- [88] H. G. Heller, Organic fatigue-resistant photochromic imaging materials. *IEEE Proc.* **1983**, *130*, 209-211.
- [89] M. Irie, Diarylethenes for memories and switches. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 1685-1716.
- [90] A. Amon, H. Bretler, A. Bleikom, Reversibly photochromic printing inks. *Patent European 0 327 788* **1989**.
- [91] N. Hampf, A. Silber, Functional dyes from nature: Potentials for technical applications. *Pure & Appl. Chem.* **1996**, *68*, 1361-1366.
- [92] J. Tittor, U. Schweiger, D. Oesterhelt, E. Bamberg, Inversion of proton translocation in bacteriorhodopsin mutants D85N, D85T and D85,96N. *Biophys. J.* **1994**, *67*, 1682-1690.
- [93] H. Kipphan, *Handbuch der Printmedien.*, Springer Verlag, Berlin, **2000**.
- [94] P. Hahne, *Innovative Drucktechnologien.*, Der Siebdruck, Lübeck, **2001**.
- [95] A. Seitz, Photochrome Zubereitungen aus Bakteriorhodopsin für die optische Aufzeichnung und für die Sicherheitstechnik. Dissertation, Philipps-Universität Marburg (Marburg), **1999**.

- [96] K. Kosswig, in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Vol. A25*, VCH, **1994**, pp. 747-817.
- [97] Unbekannt, *Produktdatenblätter Borchl Gen DFN und Borchl Gen 12.*, Borchers GmbH, Monheim, **2001**.
- [98] M. P. Gesellschaft, Polyelektrolythüllen auf biologischen Templaten *Patent Germany 1999*, WO 00/03797.
- [99] R. Jonas, Y. Koutalos, T. G. Ebrey, Yearly Review: Purple Membrane: Surface charge density and the multiple effect of pH and cation. *Photochem. Photobiol.* **1990**, *52*, 1163-1177.
- [100] Palton, *Paint flow and pigment dispersion.*, Wiley-Interscience, New York, **1979**.
- [101] S. Meyer, *Tampondruck: Verfahren und Möglichkeiten.*, Der Siebdruck, Lübeck, **1994**.
- [102] K. Mizuno, S. Okazaki, Printing color filter for active matrix liquid-crystal display color filter. *Jap. Jour. Appl. Phys.* **1991**, *30*, 3313-3317.
- [103] Y. Mori, Y. Nagae, K. Kuwabara, A new process for large-area patterning - a large area transistor circuit fabrication without using optical mask aligner. *SID Digest 1991*, *91*, 561-562.
- [104] S. Shimada, H. Watanabe, M. Tsukamoto, Manufacturing of fine-line films by printing technique. *Proceedings IMC 1990 1990*.
- [105] K. Nakao, M. Hayama, K. Kuramasu, Giant micro-electronics technology using gravure printing techniques. *Extended Abstracts of the 1991 International Conference on Solid State Devices and Materials 1991*, 599-601.
- [106] H. Stroppe, *Physik: Für Studenten der Natur- und Technikwissenschaften.*, Fachbuchverlag Leipzig, Leipzig, **1994**.
- [107] Unbekannt, *Bedienungsanleitung digital Lux-Messgerät PeakTech 5025.*, PeakTech, **2001**.
- [108] W. Greulich, *Lexikon der Physik.*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **1998**.
- [109] A. Seitz, N. Hampp, Kinetic optimization of bacteriorhodopsin films for holographic interferometry. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 7183-7192.
- [110] Y. Cao, G. Varo, M. Chang, B. Ni, R. Needleman, J. K. Lanyi, Water is required for proton transfer from aspartate-96 to the bacteriorhodopsin Schiff base. *Biochemistry* **1991**, *30*, 10972-10979.
- [111] P. W. Atkins, *Physikalische Chemie.*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, **2001**.
- [112] B. d. Unfallkassen, *Gefährdungs- und Belastungs-katalog. Verwaltung, Büroräume (Bildschirmarbeit). GUV-I8713*, Verlag Technik & Information, Boco, **2003**.
- [113] R. Govindjee, S. P. Balashov, T. G. Ebrey, Quantum efficiency of the photochemical cycle of bacteriorhodopsin. *Biophys. J.* **1990**, *58*, 597-608.
- [114] J. Tittor, D. Oesterhelt, The quantum yield of bacteriorhodopsin. *FEBS Lett.* **1990**, *263*, 269-273.
- [115] S. P. Balashov, E. S. Imasheva, R. Govindjee, T. G. Ebrey, Quantum yield ratio of the forward and back light reactions of bacteriorhodopsin at low temperature and photosteady-state concentration of the bathoproduct K. *Photochem. Photobiol.* **1991**, *54*, 955-961.
- [116] S. L. Logunov, L. Song, M. A. El-Sayed, pH Dependence of the rate and quantum yield of the retinal photoisomerization in bacteriorhodopsin. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 10674-10677.
- [117] M. Rohr, W. Gaertner, G. Schweitzer, A. R. Holzwarth, S. E. Braslavsky, Quantum yields of the photochromic equilibrium between bacteriorhodopsin and its bathointermediate K: Femto- and nanosecond optoacoustic spectroscopy. *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 6055-6061.

- [118] N. Hampp, C. Bräuchle, D. Oesterhelt, R. Thoma, Bacteriorhodopsin films as spatial light modulators for nonlinear optical filtering. *Opt. Lett.* **1991**, *16*, 651-653.
- [119] A. Rosenberg, Lichtehtheit - Eine Prüfmethode für Druckprodukte. **1999**, *11*, 70-73.
- [120] J. E. Hafemeister, J. T. Kofron, M. B. Masthay, UV-induced photodegradation of bacteriorhodopsin. *Photochem. Photobiol. Abstr. Supplement* **1993**, *57*, 61S.
- [121] U. Settele, Das photochrome Retinalprotein Bacteriorhodopsin: Charakterisierung und Anwendung in wiederbeschreibaren Bildschirmen. Dissertation, Philipps-Universität Marburg (Marburg), **1999**.
- [122] M. Dexter, *UV-Stabilizers*.
- [123] H. Böhnke, E. Hess, Lichtschutzmittel in Lacken: Möglichkeiten und Grenzen. *farbe+lack* **1989**, *95*, 715-719.
- [124] T. Juchem, Systemintegration des biologischen Photochroms Bacteriorhodopsin: Entwicklung und Charakterisierung eines holographischen Kamerasystems für die interferometrische Analyse. Dissertation, Philipps-Universität Marburg (Marburg), **2001**.
- [125] A. Popp, M. Wolperdinger, N. Hampp, C. Bräuchle, D. Oesterhelt, Photochemical conversion of the O-intermediate to 9-cis retinal containing products in bacteriorhodopsin films. *Biophys. J.* **1993**, *65*, 1449-1459.
- [126] R. R. Birge, Protein-based computers. *Sci. Amer.* **1995**, *272*, 90-95.
- [127] R. R. Birge, Branched photocycle optical memory device. *Patent U.S. 5 559 732* **1994**.
- [128] T. Fischer, N. Hampp, Two-photon-absorption of bacteriorhodopsin: Formation of a red-shifted thermally stable photoproduct F 620. *Bio. Phys. J. (accepted)*.
- [129] T. Fischer, M. Neebe, T. Juchem, N. A. Hampp, Biomolecular optical data storage and data encryption. *IEEE Transactions on Nanobiosciences* **2003**, *2*, 1-5.
- [130] N. A. Hampp, T. Fischer, Biomolecular optical storage. *Proc. IEEE-EMBS* **2002**, 74-77.
- [131] N. Hampp, T. Fischer, M. Neebe, Bacteriorhodopsin-based photochromic pigments for optical security applications. *Proc. SPIE* **2002**, *4677*, 121-128.
- [132] N. A. Hampp, M. Neebe, T. Juchem, M. Wolperdinger, M. Geiger, A. Schmuck, Multifunctional optical security features based on bacteriorhodopsin. *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.* **2004**, *5310*, 117-124.
- [133] S. Y. Zaitsev, N. M. Kozehevnikov, Y. O. Barmenkov, M. Y. Lipovskaya, Kinetics of dynamic hologram recording in polymer films with immobilized bacteriorhodopsin. *Photochem. Photobiol.* **1992**, *55*, 851-856.
- [134] M. Yamazaki, J. Goodisman, R. R. Birge, Quadratic electro-optics in bacteriorhodopsin: Measurement of $\gamma(-\omega, 0, 0, \omega)$ in dried gelatin thin films. *J. Chem. Phys.* **1998**, *108*, 5876-5887.
- [135] T. Wilhelm, J. Piel, E. Riedle, Sub-20-fs pulses tunable across the visible from a blue-pumped single-pass noncollinear parametric converter. *Opt. Lett.* **1997**, *22*, 1494-1495.
- [136] M. B. Masthay, D. M. Sammeth, M. C. Helvenston, C. B. Buckman, W. Li, M. J. Cde-Baca, J. T. Kofron, The laser-induced blue state of bacteriorhodopsin: Mechanistic and color regulatory roles of protein-protein interactions, protein-lipid interactions, and metal ions. *JACS* **2002**, *124*, 3418-3430.
- [137] F. Guessous, T. Juchem, N. Hampp, Computer generated holograms recorded in bacteriorhodopsin. *Proc. SPIE* **2004**, *5310*, 369-376.
- [138] J. Böttcher, Charakterisierung von stabilen biphotonisch induzierten Photoprodukten in Bacteriorhodopsin-Filmen. Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg (Marburg), **2005**.
- [139] N. N. Vsevolodov, V. A. Poltoratskii, Holograms in biochrome, a biological photochromic material. *Sov. Phys. Tech. Phys.* **1985**, *30*, 1235.

- [140] Y. Kimura, A. Ikegami, W. Stoeckenius, Salt and pH-dependent changes of the purple membrane absorption spektrum. Evidence for changes in conformation of the protein. *Photochem. Photobiol.* **1984**, *40*, 641-646.
- [141] C. H. Chang, R. Jonas, S. Melchiorre, R. Govindjee, T. G. Ebrey, Mechanism and role of divalent cation binding of bacteriorhodopsin. *Biophys. J.* **1986**, *49*, 731-739.
- [142] C. H. Chang, R. Jonas, R. Govindjee, T. G. Ebrey, Regeneration of blue and purple membranes from deionized bleached membranes. *Photochem. Photobiol.* **1988**, *47*, 261-265.
- [143] J. Czege, L. Reinisch, Photodestruction of bacteriorhodopsin. *Photochem. and Photobiol.* **1991**, *53*, 659-666.
- [144] I. V. Chizhov, M. Engelhard, A. V. Sharkov, B. Hess, Two quantum absorption of ultrashort laser pulses by the bacteriorhodopsin chromophore. *Structures and functions of retinal proteins* **1992**, *221*, 171-173.
- [145] F. Pedrotti, L. Pedrotti, *Optik: Eine Einführung.*, Prentice Hall, München, **1996**.
- [146] R. R. Birge, *One-photon and two-photon excitation spectroscopy.*, Academic Press, New York, **1983**.
- [147] Q. Zhong, S. Ruhman, M. Ottolenghi, M. Sheves, N. Friedman, G. H. Atkinson, J. K. Delaney, Reexamining the primary light-induced events in bacteriorhodopsin using a synthetic C13:C14-locked chromophore. *JACS* **1996**, *118*, 12828-12829.
- [148] M. C. Nuss, W. Zinth, W. Kaiser, E. Koelling, D. Oesterhelt, Femtosecond spectroscopy of the first events of the photochemical cycle in bacteriorhodopsin. *Chem. Phys. Lett.* **1985**, *117*, 1-7.
- [149] H. J. Polland, M. A. Franz, W. Zinth, W. Kaiser, E. Koelling, D. Oesterhelt, Early picosecond events in the photocycle of bacteriorhodopsin. *Biophys. J.* **1986**, *49*, 651-662.
- [150] G. G. Kochendoerfer, R. A. Mathies, Ultrafast spectroscopy of rhodopsins - photochemistry at its best! *Israel J. Chem.* **1995**, *35*, 211-226.
- [151] J. Peters, R. Peters, W. Stoeckenius, A photosensitive product of sodium borohydride reduction of bacteriorhodopsin. *FEBS Letters* **1976**, *61*, 128-134.
- [152] S. Druckmann, R. Renthal, M. Ottolenghi, W. Stoeckenius, The radiolytic reduction of the schiff base in bacteriorhodopsin. *Photochem. and Photobiol.* **1984**, *40*, 647-651.
- [153] C. B. Buckman, J. Chen, J. T. Kofron, M. B. Masthay, D. M. Sammeth, UV-induced photodegradation of bacteriorhodopsin. *Abstracts of papers of the american chemical society* **1997**, *214*, 258-Phys.
- [154] A. Gräßlin, Charakterisierung von Photoprodukten biphotonischer Prozesse in Bakteriorhodopsin. Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg (Marburg), **2004**.
- [155] R. Wobst, Harte Nüsse. Verschlüsselungsverfahren und ihre Anwendungen. *c't* **2003**, *17/2003*, 200-203.
- [156] D. Zeisel, Charakterisierung des Photochroms Bakteriorhodopsin und Untersuchung zur Photokonjugation, assoziativen Datenverarbeitung und holographischen Interferometrie. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München (München), **1993**.
- [157] Unbekannt, *Neue Perspektiven für Analytik und Diagnostik in Medizin und Ernährung durch Biochips.*, Netzwerk Biohybride Technologien Brandenburg-Berlin, **2003**.
- [158] N. Hampp, S. Fiedler, *Projektantrag für das Verbundvorhaben Bio-Mount.*, Philipps-Universität Marburg, Fraunhofer IZM, Marburg, Berlin, **2002**.
- [159] T. Lu, U. Rothe, M. Liebau, H. Schaffer, P. Hufnagel, U. Bakowsky, Investigation of the orientation of purple membrane sheets in langmuir-blodgett films by a quartz crystal microbalance. **1999**, *48*, 549-556.
- [160] G. T. Hermanson, *Bioconjugate techniques.*, Academic Press, San Diego, **1996**.

- [161] S. S. Wong, *Chemistry of protein conjugation and cross-linking.*, CRC Press, Boca Raton, **1993**.
- [162] P. Wagner, M. Hegner, P. Kernen, F. Zaugg, G. Semenza, Covalent immobilization of native biomolecules onto Au(111) via N-hydroxysuccinimide ester functionalized self-assembled monolayers for scanning probe microscopy. *Biophysical Journal* **1996**, *70*, 2052-2066.
- [163] T. Fischer, N. Hampp, Erforschung des Einsatzpotentials biomimetischer Verfahren zur Selbstassemblierung optoelektronischer Komponenten in der Mikrosystemtechnik am Beispiel von Purpurmembran-Elektroden-Arrays. *Schlussbericht BMBF* **2004**, *FKZ 16SV1637*, 1-22.
- [164] S. Fiedler, Erforschung des Einsatzpotentials biomimetischer Verfahren zur Selbstassemblierung optoelektronischer Komponenten in der Mikrosystemtechnik am Beispiel von Purpurmembran-Elektroden-Arrays. *Schlussbericht BMBF* **2004**, *FKZ 16SV1636*.
- [165] Y. Kimura, A. Ikegami, K. Ohno, S. Saigo, Y. Takeuchi, Electric dichroism of purple membrane suspensions. *Photochem. Photobiol.* **1981**, *33*, 435-439.
- [166] K. Barabas, A. Der, Z. Dancshazy, P. Ormos, L. Keszthelyi, M. Marden, Electro-optical measurements on aqueous suspension of purple membrane from halobacterium halobium. *Biophys. J.* **1983**, *43*, 5-11.
- [167] L. Keszthelyi, P. Ormos, Displacement current of purple membrane fragments oriented in a suspension. *Biophys. Chem.* **1983**, *18*, 397-405.
- [168] S. R. Caplan, G. Fischer, Photovoltaic behavior of bacteriorhodopsin-loaded cation-exchange membranes. *J. Membrane. Sci.* **1983**, *16*, 391-405.
- [169] S. Kunugi, T. Kusano, H. Yamada, Y. Nakamura, Orientation and immobilization of bacteriorhodopsin in polyacrylamid gel membranes. *Polymer Bull.* **1988**, *19*, 417-421.
- [170] A. Der, P. Hargittai, J. Simon, Time resolved photoelectric and absorption signals from oriented purple membrane immobilized in gel. *J. Biochem. Biophys. Meth.* **1985**, *10*, 295-300.
- [171] S. Y. Liu, T. G. Ebrey, Photocurrent measurements of the purple membrane oriented in a polyacrylamide gel. *Biophys. J.* **1988**, *54*, 321-329.
- [172] L. Keszthelyi, Orientation of purple membranes by electric field. *Methods Encymol.* **1982**, *88*, 287-297.
- [173] A. A. Kononenko, E. P. Lukashev, A. V. Maximychev, S. K. Chamorovsky, A. B. Rubin, S. F. Timashev, L. N. Chekulaeva, Oriented purple-membrane films as a probe for studies of the mechanism of bacteriorhodopsin functioning. I. The vectorial character of the external electric-field effect on the dark state and the photocycle of bacteriorhodopsin. *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, *850*, 162-169.
- [174] K. Nagy, Photoelectric activity of dried, oriented layers of purple membrane from halobacterium halobium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1978**, *85*, 383-390.
- [175] G. Varo, Dried oriented purple membrane samples. *Acta. Biol. Acad. Sci. Hung.* **1981**, *32*, 301-310.
- [176] A. A. Kononenko, E. P. Lukashev, S. K. Chamorovsky, A. V. Maximychev, E. P. Timashev, L. N. Chekulaeva, A. B. Rubin, V. Z. Paschenko, Oriented purple membrane films as a probe for studies of the mechanism of bacteriorhodopsin functioning. II: Photoelectric processes. *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *892*, 56-67.
- [177] K. A. Fisher, K. C. Yanagimoto, W. Stoeckenius, Oriented adsorption of purple membrane to cationic surfaces. *J. Cell. Biol.* **1978**, *77*, 611-621.
- [178] S. Ueno, A. Shibata, Redox potential of bacteriorhodopsin in oriented purple membrane films. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2002**, *23*, 383-390.

- [179] R. A. Brizzolara, J. L. Boyd, A. E. Tate, Evidence for covalent attachment of purple membrane to a gold surface via genetic modification of bacteriorhodopsin. *Journal of Vacuum Science & Technology, A: Vacuum, Surfaces, and Films* **1997**, *15*, 773-778.
- [180] J. P. Whitelegge, C. B. Gundersen, K. F. Faull, Electrospray-ionization mass spectrometry of intact intrinsic membrane proteins. *Protein Science* **1998**, *7*, 1423-1430.
- [181] P. A. Schindler, A. v. Dorsselaer, A. M. Falick, Analysis of hydrophobic proteins and peptides by electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* **1993**, *213*, 256-263.
- [182] J. Schaller, B. C. Pellascio, U. P. Schlunegger, Analysis of hydrophobic proteins and peptides by electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* **1997**, *11*, 418-426.
- [183] D. R. Barnidge, E. A. Dratz, A. J. Jesaitis, J. Sunner, Extraction method for analysis of detergent-solubilized bacteriorhodopsin and hydrophobic peptides by electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* **1999**, *269*, 1-9.
- [184] P. Hufnagel, U. Schweiger, C. Eckerskorn, D. Oesterheld, Electrospray ionization mass spectrometry of genetically and chemically modified bacteriorhodopsins. *Analytical Biochemistry* **1996**, *243*, 46-54.
- [185] K. K. Hixson, N. Rodriguez, D. G. Camp, E. F. Strittmatter, M. S. Lipton, R. D. Smith, Evaluation of enzymatic digestion and liquid chromatography-mass spectrometry. Peptide mapping of the integral membrane protein bacteriorhodopsin. *Electrophoresis* **2002**, *23*, 3224-3232.
- [186] L. E. Ball, J. E. Oatis, K. Dharmasiri, M. Busman, J. Wang, L. B. Cowden, A. Galijatovic, N. Chen, R. E. Crouch, D. R. Knapp, Mass spectrometric analysis of integral membrane proteins: Application to complete mapping of bacteriorhodopsins and rhodopsin. *Protein Science* **1998**, *7*, 758-764.
- [187] Z. Ablonczy, M. Kono, R. K. Crouch, D. R. Knapp, Mass spectrometric analysis of integral membrane proteins at the subnanomolar level: Application to recombinant photopigments. *Analytical Chemistry* **2001**, *73*, 4774-4779.
- [188] P. Kraft, J. Mills, E. Dratz, Mass spectrometric analysis of cyanogen bromide fragments of integral membrane proteins at the picomole level: Application to rhodopsin. *Analytical Biochemistry* **2001**, *292*, 76-86.
- [189] G. E. Gerber, H. G. Khorana, Primary structure of bacteriorhodopsin: Sequencing methods for membrane proteins. *Methods Enzymol.* **1982**, *88*, 56-74.
- [190] W. Stoeckenius, Bacterial rhodopsins: Evolution of a mechanistic model for the ion pumps. *Protein Science* **1999**, *8*, 447-459.
- [191] M. Brinkley, A brief survey of methods for preparing protein conjugates with dyes, haptens, and cross-linking reagents. *Bioconjugate Chem.* **1992**, *3*, 2-13.
- [192] G. Mattson, E. Conklin, S. Desai, G. Nielander, M. D. Svage, S. Morgensen, A practical approach to crosslinking. *Molecular Biology Reports* **1993**, *17*, 167-183.
- [193] P. Cuatrecasas, I. Parikh, Adsorbents for affinity chromatography. Use of N-hydroxysuccinimide esters of agarose. *Biochemistry* **1972**, *11*, 2291-2299.
- [194] A. J. Lomant, G. Fairbanks, Chemical probes of extended biological structures: Synthesis and properties of the cleavable cross-linking reagent [³⁵S] dithiobis(succinimidylpropionate). *J. Mol. Biol.* **1976**, *104*, 243-261.
- [195] J. V. Staros, Membrane-impermeant cross-linking reagents: Probes of the structure and dynamics of membrane proteins. *Acc. Chem. Res.* **1988**, *21*, 435-441.
- [196] K. M. Schwartz, Purpurchmembran als Templatstruktur für Hybridmaterialien: Chemische und enzymatische Modifikation. Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg (Marburg), **2003**.

- [197] J. Heberle, N. Dencher, Surface bound optical probes monitor proton translocation and surface potential changes during the bacteriorhodopsin photocycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89*, 5996-6000.
- [198] N. Sigrist, P. Allegrini, K. Stauffer, J. Schaller, N. Abdulaev, E. Rickli, P. Zahler, Group-directed modification of bacteriorhodopsin by arylisothiocyanates. *J. Mol. Biol.* **1984**, *173*, 93-108.
- [199] D. C. Chiara, *Private communications.*, Harvard Medical School, Boston.
- [200] J. J. Pisano, J. S. Finlayson, M. P. Peyton, Cross-link in fibrin polymerized by factor 13: ϵ -(γ -glutamyl)lysine. *Science* **1968**, *160*, 892-893.
- [201] J. S. Finlayson, J. E. Folk, The ϵ -(8-glutamyl)lysine cross-link and the catalytic role of transglutaminases. *Adv. Prot. Chem.* **1977**, *31*, 1-133.
- [202] R. Pasternack, H. L. Fuchsbauer, Biologische Proteinquervernetzer für Produkte von morgen. *Querschnitt Beiträge aus Forschung und Entwicklung* **1996**, *10*, 1-13.
- [203] A. Seitz, T. Schneider, R. Pasternack, H.-L. Fuchsbauer, N. Hampp, Enzymatic crosslinking of purple membranes catalyzed by bacterial transglutaminase. *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 233-238.
- [204] C. Niemeyer, C. Mirkin, *Nanobiotechnology.*, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.
- [205] E. A. Bayer, M. G. Zalis, M. Wilchek, 3-(N-Maleimido-propionyl) biocytin: A versatile thiol-specific biotinylation reagent. *Anal. Biochem.* **1985**, *149*, 529-536.
- [206] E. Hochuli, H. Döbeli, A. Schacher, New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptide containing neighbouring histidine residues. *J. of Chrom.* **1987**, *411*, 177-184.
- [207] E. L. Schmid, T. A. Keller, Z. Dienes, H. Vogel, Reversible oriented surface immobilization of functional proteins on oxide surfaces. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 1979-1985.
- [208] S. J. Kline, D. A. Betebenner, D. K. Johnson, Carboxymethyl-substituted bifunctional chelators: Preparation of aryl isothiocyanate derivatives of 3-(Carboxymethyl)-3-azapentanedioic acid, 3,12-bis(carboxymethyl)-6,9-dioxa-3,12-diazatetradecanedioic acid, and 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid for use as protein labels. *Bioconjugate Chem.* **1991**, *2*, 26-31.
- [209] J. Houben, T. Weyl, *Methoden der organischen Chemie.*, Thieme, Stuttgart, **1983**.
- [210] L. Jin, X. Wei, J. Gomez, M. Datta, A. Birkett, D. L. Peterson, Use of α -N,N-bis[carboxymethyl]lysine-modified peroxidase in immunoassays. *Anal. Biochem.* **1995**, *229*, 54-60.
- [211] R. Gamsjaeger, B. Wimmer, H. Kahr, A. Tinazli, S. Picuric, S. Lata, R. Tampe, Y. Maulet, H. J. Gruber, P. Hinterdorfer, C. Romanin, Oriented binding of the His₆-tagged carboxyl-tail of the L-type Ca²⁺ channel α_1 -subunit to a new NTA-functionalized self-assembled monolayer. *Langmuir* **2004**, *20*, 5885-5890.
- [212] A. Fallert-Müller, *Lexikon der Biochemie.*, Elsevier, München, **1999**.
- [213] H. G. Gassen, G. Schrimpf, *Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor.*, Spektrum, Akad. Verl., Berlin, **1999**.
- [214] L. Libioulle, A. Bietsch, H. Schmid, B. Michel, Contact-inking stamps for microcontact printing of alkanethiols on gold. *Langmuir* **1999**, *15*, 300-304.
- [215] A. Kumar, H. A. Biebuyck, M. Whitesides, Patterning self-assembled monolayers: Applications in materials science. *Langmuir* **1994**, *10*, 1498-1511.
- [216] M. Geissler, H. Wolf, R. Stutz, E. Delmarche, U.-W. Grummt, B. Michel, A. Bietsch, Fabrication of metal nanowires using microcontact printing. *Langmuir* **2003**, *19*, 6301-6311.