

Photochrome Zubereitungen aus Bakteriorhodopsin für die optische Aufzeichnung und für die Sicherheitstechnik

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

dem Fachbereich Chemie
der Philipps Universität Marburg

vorgelegt von

Dipl. Chem. Arne Seitz

aus Ludwigshafen/Rh.

Marburg/Lahn 1999

Einzelne Teile der Arbeit wurden vorab veröffentlicht:

1. N. Hampp, A. Seitz, T. Juchem, D. Oesterhelt
Large diameter bacteriorhodopsin films for application in non-destructive testing.
Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng. 3623 (1999) 243-251.
2. N. Hampp, A. Seitz
Verfahren und Zubereitung zur photochromen Markierung und/oder Sicherung der Authentizität von Gegenständen.
Deutsche Patentanmeldung 199 14 702.7 (1999).
3. N. Hampp, A. Seitz, R. Pasternack, H. L. Fuchsbauer
Linkerfreie kovalente Kopplung von Bakteriorhodopsin in Purpormembranen-Form.
Deutsche Patentanmeldung 199 53 607.4 (1999).
4. A. Seitz, N. Hampp
Kinetic Optimization of Bacteriorhodopsin Films for Holographic Interferometry.
Journal of Physical Chemistry (eingereicht)
5. A. Seitz, R. Pasternack, L. Fuchsbauer, N. Hampp
Enzymatic crosslinking of Bacteriorhodopsin.
FEBS-Letters (in Vorbereitung)
6. N. Hampp, M. Neebe, A. Seitz
Printing Inks Containing the photochromic Protein Bacteriorhodopsin.
Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng. (in Vorbereitung)

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	BAKTÉRIORHODOPSIN	4
2.1	Vorkommen	4
2.2	Eigenschaften	5
2.3	Der Photozyklus von Bakteriorhodopsin	7
2.4	Technische Anwendungen von Bakteriorhodopsin	10
2.5	Modifikationsmöglichkeiten	11
3	MATERIAL UND METHODEN	13
3.1	Chemikalien	13
3.1.1	Herkunft	13
3.1.2	Einstellung der relativen Feuchte	13
3.2	Bakteriorhodopsin	14
3.2.1	Herstellung und Reinigung	14
3.2.2	BR-crude	14
3.2.3	Lyophilisiertes Bakteriorhodopsin	14
3.3	Bakterielle Transglutaminase	14
3.4	Biochemische Methoden	15
3.4.1	Gelelektrophoretische Analyse von Proteinen	15
3.4.1.1	<i>Analytische Tris-Glycin-Gele</i>	15
3.4.1.2	<i>Protein-Molekulargewichtsstandards</i>	16
3.4.1.3	<i>Proteinfärbungen</i>	17
3.4.2	Sedimentation	17
3.5	Physikalische Methoden	18
3.5.1	Absorptionseigenschaften	18
3.5.2	pH-Wert-Messung	18
3.5.3	Rheologie	18
3.6	Charakterisierung von Bakteriorhodopsin-Filmen und Schichten	19
3.6.1	Einführung	19
3.6.2	Vereinfachter Photozyklus von Bakteriorhodopsin	19
3.6.3	Meßaufbau	21
3.6.4	Meßgrößen	22
3.7	Herstellung von Bakteriorhodopsin Filmen und Schichten	27
3.7.1	Einführung	27
3.7.2	Matrixmaterial	27
3.7.3	Einstellung der Protonenverfügbarkeit	28
3.7.4	Gießverfahren	29
3.7.5	Filmaufziehverfahren	29

INHALTSVERZEICHNIS

4	ENZYMATISCHE QUERVERNETZUNG VON BAKTERIORHODOPSIN	30
4.1	Einleitung	30
4.2	Ergebnisse	32
4.3	Interpretation	36
4.4	Zusammenfassung	37
5	CHARAKTERISIERUNG VON BAKTERIORHODOPSINSCHICHTEN	38
5.1	Zielsetzung	38
5.2	Einfluß von Zusätzen auf $B_{\text{recovery}}/M_{\text{decay}}$	39
5.2.1	Versuchsdurchführung	39
5.2.2	Einfluß auf BR-WT	40
5.2.2.1	<i>Arginin</i>	40
5.2.2.2	<i>Glyzerin</i>	41
5.2.2.3	<i>Arginin und Glyzerin</i>	42
5.2.3	Einfluß auf BR-D96N	43
5.2.3.1	<i>Arginin</i>	43
5.2.3.2	<i>Glyzerin</i>	45
5.2.3.3	<i>Arginin und Glyzerin</i>	46
5.2.4	Einfluß des Trocknungsgrades	48
5.2.5	Zusammenfassung und Interpretation	59
5.3	Einfluß des Wassergehalts auf M-Decay/B-Recovery	53
5.3.1	Einführung	53
5.3.2	Einfluß des pH-Wertes	53
5.3.2.1	<i>Versuchsdurchführung</i>	53
5.3.2.2	<i>Ergebnisse für BR-WT</i>	54
5.3.2.3	<i>Ergebnisse für BR-D96N</i>	56
5.3.2.4	<i>Vergleich von BR-WT und BR-D96N</i>	58
5.3.3	Abhängigkeit vom Bleichungsgrad	59
5.3.4	Zusammenfassung und Interpretation	63
5.4	Einfluß des Wassergehalts auf M-Rise/B-Decay	64
5.4.1	Einführung	64
5.4.2	Bleichbarkeit	64
5.4.2.1	<i>BR-D96N</i>	64
5.4.2.2	<i>BR-WT</i>	67
5.4.3	Kinetisches Verhalten	69
5.4.4	Interpretation und Diskussion	73
5.5	Modifiziertes Photozyklusmodell	75
5.6	Zusammenfassung	77

6	EINSATZ VON BAKTERIORHODOPSIN-FILMEN IN DER HOLOGRAPHISCHEN INTERFEROMETRIE	78
6.1	Einführung	78
6.2	Photochemische Optimierung von Bakteriorhodopsin-Filmen	80
6.3	Holographische Interferometrie mit Bakteriorhodopsin-Filmen	83
6.3.1	Meßaufbau	83
6.3.2	Großflächige BR-Filme	84
6.3.3	Bakteriorhodopsin-Filme mit erhöhter Lichtempfindlichkeit	88
6.4	Zusammenfassung	89
7	EINSATZ VON BAKTERIORHODOPSIN IN DER SICHERHEITSTECHNIK	90
7.1	Einleitung	90
7.2	Herstellung photochromer Mischungen mit Bakteriorhodopsin	93
7.2.1	Zielsetzung	93
7.2.2	Wahl des Matrixmaterials	93
7.2.3	Pigmentierung der Matrixmaterialien	94
7.3	Farbrezepturen für verschiedene Applikationsverfahren	96
7.3.1	Siebdruck	96
7.3.1.1	<i>Anforderungen an das Fließverhalten</i>	97
7.3.1.2	<i>Schaumbildung</i>	99
7.3.1.3	<i>Oberflächenverlauf</i>	100
7.3.2	Offsetdruck	102
7.4	Demonstrationsbeispiele	104
7.5	Zusammenfassung	108
8	ZUSAMMENFASSUNG	110
9	LITERATURVERZEICHNIS	113

1 EINLEITUNG

„Die Biotechnologie, d.h. die technische Anwendung von Erkenntnissen der Biowissenschaften, gilt als eine Schlüsseltechnologie des 21. Jahrhunderts. Bereits heute wird ihr ein ähnlicher Stellenwert wie der Mikroelektronik und Informationstechnologie für Wirtschaft und Gesellschaft beigemessen.“ [1]

Deshalb finden biologische Materialien bei der Suche nach Molekülen mit definierten physikalischen Funktionen in letzter Zeit verstärkt Beachtung. Die Synthese solch funktioneller Moleküle übersteigt derzeit die wissenschaftlichen Möglichkeiten.

Biologische Systeme sind in einer Jahrmillionen dauernden Evolution von der Natur an die natürlichen Umgebungsbedingungen angepaßt und damit optimiert worden. Daher erscheint es reizvoll die Eigenschaften der optimierten Systeme in technische Anwendungen zu transferieren und nutzbar zu machen. Durch gentechnologische Methoden, deren Entwicklung in den letzten 20 Jahren stark voran getrieben wurde, besteht zudem die Möglichkeit, die Materialien, bei Kenntnis der molekularen Wirkungsweise gezielt auf eine Anwendung hin zu optimieren.

Die Einsatzgebiete biologischer Materialien decken dabei einen weiten Bereich ab und reichen von medizinischen Anwendungen bis hin zur Nutzung des sogenannten „Lotus-Effektes“ [2].

Bei der Umsetzung einer potentiellen Anwendung in eine technischen Nutzung der Systeme/des Materials spielen neben Fragestellungen mit wissenschaftlichen Hintergrund (z.B. wie biologische Materialien in technische Prozeßschritte integriert werden können) auch wirtschaftliche Fragestellungen eine entscheidende Bedeutung. Dabei ist die den Preis bestimmende Verfügbarkeit des Materials von entscheidender Bedeutung.

Deshalb widmet sich diese Arbeit der Fragestellung, wie die Lücke zwischen einer potentiellen Anwendung und deren technischer Umsetzung geschlossen werden kann. Als Modellsystem bietet sich dabei das Membranprotein Bakteriorhodopsin an, das aus Zellen von *Halobacterium salinarum* gewonnen werden kann.

In der Zelle des Bakterium fungiert Bakteriorhodopsin als lichtgetriebene Protonenpumpe [3] um ihm damit das Überleben unter extremen Umweltbedingungen, wie sie z.B. in Salinen und Salzseen herrschen (hohe Salzkonzentration, niedrige Sauerstoffkonzentration), zu ermöglichen. Für ein biologisches Material weist Bakteriorhodopsin eine außergewöhnlich hohe Stabilität

gegenüber Umwelteinflüssen¹ auf, die es für technische Anwendung besonders attraktiv macht. Sie ist auf den in der Natur äußerst seltenen zweidimensionalen Kristallverband zurückzuführen, den Bakteriorhodopsin in der Zellwand des Bakteriums, der sogenannten Purpurmembran ausbildet. Darüber hinaus gehört Bakteriorhodopsin zur Zeit zu den am besten charakterisierten Membranproteinen [5]. Mit ein Grund dafür, daß eine Vielzahl von gentechnologisch erzeugter Mutanten zur Verfügung steht und daß die Kosten für die Herstellung des Materials in letzter Zeit drastisch gesenkt werden konnten.

Kurz nach seiner Entdeckung wurden für Bakteriorhodopsin eine Vielzahl von potentiellen Anwendungen vorgeschlagen. Optische Anwendungen nehmen dabei seit jeher eine herausragende Bedeutung ein. Grund dafür ist die Photochromie von Bakteriorhodopsin, die durch den sogenannten Photozyklus beschrieben wird und an den Protonentransport durch die Membran gekoppelt ist.

Zur Realisierung einer optischen Anwendung mit Bakteriorhodopsin müssen die Purpurmembranfragmente (PM) in einer Matrix immobilisiert werden. Dieser Prozeß wird als Filmherstellung bezeichnet. Neben der Verwendung gentechnologischer BR-Mutanten besteht die Möglichkeit, die photochemischen Eigenschaften von Bakteriorhodopsin durch die Präparationsbedingungen zu beeinflussen. Die Filmherstellung ist damit ein entscheidender Schritt zur Realisierung einer optischen Anwendung mit Bakteriorhodopsin.

Im Rahmen der Arbeit wird ein Verfahren vorgestellt, mit dem es möglich ist, Bakteriorhodopsin in membrangebundener Form zu vernetzen. Dieses Verfahren zeichnet sich dadurch aus, daß es besonders schonend ist und deshalb Vorteile im Vergleich zu herkömmlichen Vernetzungsreagenzien besitzt. Ein Einsatz dieses Verfahrens z.B. bei der Herstellung trägerfreier Filme ist durchaus denkbar.

Daneben sollten für die holographische Interferometrie BR-Filme optimiert werden. Eingesetzt wird dieses kohärent optische Meßverfahren zur zerstörungsfreien Prüfung von Werkstoffen. Die Intensität des vom zu untersuchenden Objektes diffus reflektierten Lichts ist sehr gering. Deshalb spielt die Lichtempfindlichkeit der BR-Filme eine entscheidende Rolle. Hauptsächlich ist sie von der Lebensdauer des langlebigsten Intermediates im Photozyklus abhängig, die in Abhängigkeit

¹In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, daß Extremophile bzw. deren Bestandteile wie z.B. Enzyme, auf Grund ihrer außergewöhnlichen Eigenschaften, besonders aber wegen ihrer hohen Beständigkeit gegenüber Umwelteinflüssen in letzter Zeit verstärkt erforscht werden [117].

von dem verwendeten Material (Wildtyp/Mutante) durch den pH-Wert und den Wassergehalt des umgebenden Matrixmaterials beeinflusst werden kann. Die molekularen Ursachen der genannten Parameter und vor allen Dingen die Kombination der Effekte sollte untersucht werden, um daraus eine Optimierungsstrategie zur Filmherstellung ableiten zu können und die Lichtempfindlichkeit der BR-Filme und damit des gesamten holographischen Systems steigern zu können.

Neben der photochemischen Optimierung sollte ein Verfahren entwickelt werden, daß die reproduzierbare Herstellung großer BR-Filme ermöglicht, um große Objekte ohne Verwendung optischer Bauteile, wie z.B. Linsen aufzeichnen zu können.

Darüber hinaus sollten die Möglichkeiten des Einsatzes von Bakteriorhodopsin in der Sicherheitstechnik vorgestellt und demonstriert werden. Dabei handelt es sich um eine Anwendung, die noch vor einigen Jahren an der Verfügbarkeit des Materials gescheitert wäre und die im Gegensatz zu Anwendungen wie der holographischen Interferometrie voraussetzt, daß das biologische Material Bakteriorhodopsin, in einen technischen Prozess integriert wird. Denn ein Einsatz von Bakteriorhodopsin in der Sicherheitstechnik, bei dem der lichtinduzierte Farbwechsel von BR ausnutzt werden soll, ist nur dann sinnvoll möglich, wenn die Applikation über ein herkömmliches reproduzierendes Druckverfahren erfolgen kann.

Ziel war deshalb die Entwicklung und Herstellung von Farben mit Bakteriorhodopsin als photochromer Komponente, die mittels gängiger Drucktechniken (z. B. Siebdruck) aufgebracht werden können. Ein Hauptproblem war dabei die mögliche Schädigung des biologischen Materials durch die beim Applikationsprozess auftretenden Kräfte (z.B. Scherkräfte) und die bei Druckfarben üblicherweise eingesetzten Hilfsstoffe (z.B. Tenside). Neben der Demonstration der konkreten Anwendung sollte damit auch geklärt werden, inwieweit Bakteriorhodopsin in ein technisches Verfahren eingegliedert werden kann.

2 BAKTERIORHODOPSIN

2.1 Vorkommen

Das integrale Membranprotein Bakteriorhodopsin (BR) ist Bestandteil der Zellmembran von *Halobacterium salinarum*. Diese Bakterien, die zu den Archaeobakterien gezählt werden, leben unter extremen Umweltbedingungen in einer ökologischen Nische, wie z.B. Salzseen oder Salinen. Bei ausreichendem Sauerstoffgehalt der Umgebung decken sie ihren Energiebedarf durch oxydativen Metabolismus. Sinkt die Sauerstoffkonzentration, synthetisieren sie in ihrer Zellmembran einen charakteristischen Bereich, die sogenannte Purpurnembran (PM). Bakteriorhodopsin, Hauptbestandteil dieser Membran, hat die Funktion einer lichtgetriebenen Protonenpumpe. Der erzeugte Protonengradient wird von den ATP-Synthasen dazu verwendet ATP zu synthetisieren. Damit kann die Zelle ihren Energiestoffwechsel aufrecht erhalten.

Neben BR kommen noch drei andere Proteine in der PM vor. Zum einen Halorhodopsin (HR), eine einwärts gerichtete Chloridpumpe [6] [7], die dazu beiträgt während des Zellwachstums isoosmolare Bedingungen im Zytoplasma zu gewährleisten, zum anderen die beiden Sensorrhodopsine (SRI und SRII) [8] [9], die das phototaxische Verhalten der Zelle beeinflussen. Durch deren Funktion ist es der Zelle möglich, schädliches Blau- und UV-Licht zu meiden und Bereiche aufzusuchen, die vorteilhaft für phototropes Wachstum sind [10].

BR bildet in der PM zweidimensionale kristalline Bereiche von bis zu einem Mikrometer Durchmesser aus. Das Kristallgitter der PM ist hexagonal (P3), wobei jeder Gitterpunkt von einem BR-Trimer besetzt ist. Die BR Moleküle sind so orientiert, daß sich der Aminoterminus auf der extrazellulären Seite (EC) und der Carboxyterminus auf der zytoplasmatischen Seite (CP) der Membran befindet. Weitere Bestandteile der PM sind die Membran stabilisierende Lipidmoleküle (molares Verhältnis Lipid / BR: 10/1, Masse: 25/75) [11-13].

Die Eigenschaften von PM sind in der folgenden **Table 1** zusammengefaßt. Bemerkenswert ist vor allen Dingen die für ein biologisches System außerordentlich hohe Beständigkeit von BR in membrangebundener Form (PM) gegenüber Umwelteinflüssen, die sie für etwaige technische Anwendungen sehr attraktiv macht. Die Stabilität ist jedoch an den Kristallverbund der PM gebunden; wird der zweidimensionale Verband zerstört, so verliert das BR seine Stabilität.

Tabelle 1: Eigenschaften der Purpurmembran (nach [14] und [15])

Dimension	Dicke 5 nm, Durchmesser bis zu 5 μm
kristalline Struktur	2-dimensional, hexagonaler Kristall aus BR Trimeren, eingelagert in Lipiddoppelschichten
Stabilität bei	konstanter Belichtung Sauerstoffanwesenheit und Belichtung Temperatur < 140 °C [16] pH-Wert zwischen 2 und 12 Einbettung in hydrophile Polymere (Polyacrylamid, Polyvinylalkohol und Gelatine)
Trocknen	Farbe und photochemische Aktivität bleiben erhalten

2.2 Eigenschaften

Bakteriorhodopsin besteht aus einer Polypeptidkette (248 Aminosäuren, 27 kDa) und einem Retinalmolekül, das über eine Imin-Bindung („Schiff’sche Base“) an den Lysinrest K216 der Kette gebunden ist. Wie alle halobakteriellen Retinalproteine gehört es zur Familie der Membranproteine, die aus sieben transmembranen α -Helices aufgebaut sind. Bekannte eukaryontische Vertreter dieser Klasse sind die Rhodopsine der Sehsysteme der Wirbeltiere.

Die Struktur von Bakteriorhodopsin konnte in den letzten Jahren durch neue Kristallisationsmethoden bis zu einer Auflösung von 2.3 Å bestimmt werden [17-20]. In **Abb. 1** ist die Struktur eines Bakteriorhodopsinmoleküls schematisch dargestellt. Die sieben Helices sind ringförmig und annähernd parallel angeordnet und bilden einen Ionenkanal, durch den das Proton transportiert wird. Das Retinalmolekül liegt als licht-getriggelter Schalter zwischen zytoplasmatischer und extrazellulärer Halbpore. Lichtabsorption bewirkt eine all-*trans* /13-*cis* Isomerisierung des Retinals. Diese bewirkt eine Serie von transienten pK_a -Wert Änderungen (a) im Retinal der Schiff’schen Base, (b) beim extrazellulären Protonen Donator-Komplex, der u.a. Asp85 enthält und (c) im zytoplasmatischen Protonenakzeptor Komplex, der u.a. Asp96 enthält. Die zeitliche Abfolge der pK_a -Wert Änderungen nach der Photoisomerisierung ist die Ursache für einen sequentiellen Protonentransfer [21]. Durch die De- und Reprotonierung der Aminosäuren Asp85 und Asp96 aus dem umgebenden Medium, wird in BR unter Lichteinwirkung ein unidirektionaler Nettoprotonentransport über 48 Å induziert. Der Weg des Protons von der zytoplasmatischen Seite zur extrazellulären Seite ist durch Pfeile verdeutlicht.

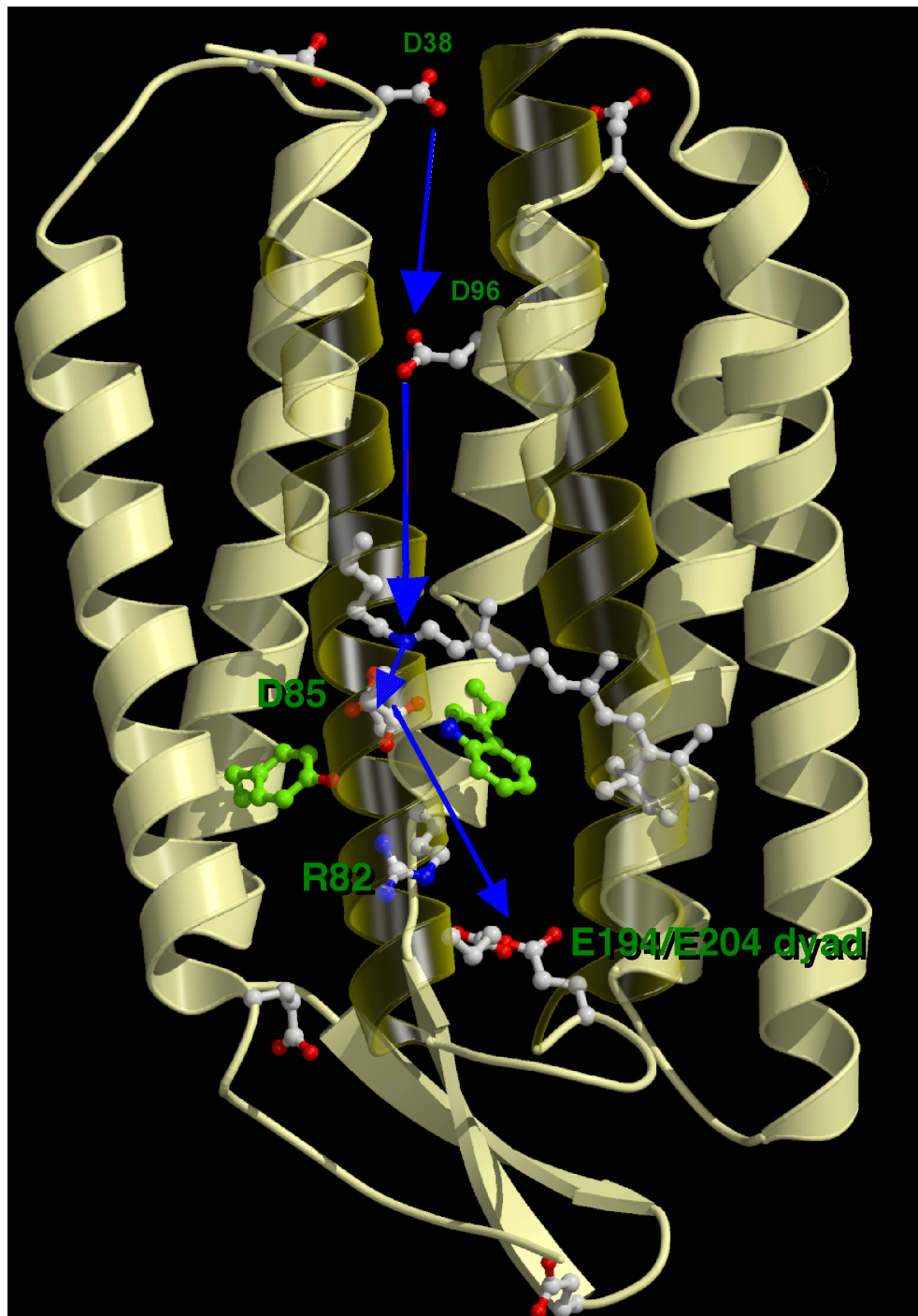


Abb. 1: Schematisches Strukturmodell von Bakteriorhodopsin. Alle Strukturdaten stammen aus [22]. Die sieben transmembranen α -Helices bilden eine Ionen-pore. In der Mitte dieser Pore, durch die Protonen gepumpt werden, liegt das Retinalmolekül als licht-getriggert Schalter. Der Weg eines Protons von der zytoplasmatischen zur extrazellulären Seite ist durch blaue Pfeile verdeutlicht.

Der Proteinanteil in Bakteriorhodopsin ist dafür verantwortlich, daß die Photoisomerisierung des Retinals stereoselektiv, reversibel und mit hoher Ausbeute stattfindet. Eine Belichtung von freiem Retinal führt nämlich zu einem Produktgemisch mit verschiedenen Retinalisomeren. Weiterhin erfährt das Absorptionsmaximum des Retinalaldehyds (Vitamin A Aldehyd) durch den Einbau in die Proteinmatrix eine bathochrome Verschiebung um etwa 200 nm und absorbiert damit im grünen Bereich (500-600 nm) der sichtbaren Wellenlängen. Diese Rotverschiebung wird als "opsin shift" bezeichnet. Zu seiner Erklärung werden in [23] unterschiedliche Mechanismen vorgeschlagen und diskutiert: (a) Eine Verlängerung des konjugierten π -Systems, da der Cyclohexenring und die ungesättigte Seitenkette durch das Proteingerüst in eine Ebene gedrückt werden, (b) Delokalisation des π -Systems, aufgrund schwächerer Wechselwirkungen zwischen der protonierten Schiff'schen Base und deren Gegenion oder (c) Wechselwirkungen zwischen dem Chromophor und polaren oder polarisierbaren Gruppen im Proteingerüst. Der Anteil der einzelnen Effekte wird zum Teil noch kontrovers diskutiert [23]. Unstrittig ist dagegen die Bedeutung dieses Effektes. Er ist dafür verantwortlich, daß das Bakterium Sonnenlicht („grünes Licht“) in Energie (Protonengradient) umwandelt und unter extremen physiologischen Bedingungen (hohe Salzkonzentration, niedrige Sauerstoffkonzentration) überleben kann.

2.3 Der Photozyklus von Bakteriorhodopsin

Mit dem zum Überleben in der ökologischen Nische notwendigen Protonentransport wird der sogenannte Photozyklus von Bakteriorhodopsin durchlaufen. Dieser sequentielle Zyklus, der auf Varo und Lanyi zurückgeht [24], ist in **Abb. 2** dargestellt. Die Intermediate² sind mit den üblichen Einbuchstabencodes abgekürzt und werden durch die Angabe des Absorptionsmaximums näher spezifiziert. Photochemische Schritte sind durch dicke Pfeile, thermische durch dünne Pfeile gekennzeichnet. Bei allen rechts kursiv gedruckten Intermediaten liegt das lichtabsorbierende Chromophor Retinal in der 13-*cis* Konfiguration vor. Das Ausgangsintermediat B₅₇₀ ist durch eine all-*trans* Konfiguration des Retinals gekennzeichnet. Zwischen dem B₅₇₀ Intermediat und dem D₅₄₈ Intermediat liegt ein photochemisches und thermisches Gleichgewicht vor. In Abwesenheit von Licht verschiebt sich dieses Gleichgewicht thermisch zu Gunsten des D₅₄₈ Intermediates. Belichtung des dunkeladaptierten Zustands führt dagegen

² Eine zusammenfassende Beschreibung der einzelnen Intermediate ist in [5] zu finden. Die Beschreibung der Intermediate ist von dort in modifizierter Form übernommen.

dazu, daß der sogenannte lichtadaptierte Zustand erreicht wird [25][26]. In diesem Fall liegt das Retinal fast ausschließlich in der all-*trans* Konfiguration vor.

Durch Licht geeigneter Wellenlänge können die Elektronen des lichtadaptierten Moleküls BR (Retinalkonfiguration all-*trans*) angeregt werden. Sie befinden sich dann in der Franck-Condon Region des angeregten Zustands (S_1). Von dort fallen die Elektronen in die Grundzustände S_0 zurück. Die Quantenausbeute für die Photoisomerisierung beträgt $\Phi=0.64$ [27], d.h. 36 % der angeregten Moleküle kehren zum ursprünglichen Zustand zurück. Nach dem konventionellen Zwei-Zustandsmodell zerfällt der angeregte Zustand $BR^*(FC)$ über einen weiteren angeregten Zustand (BR^*) zu einem elektronischen Grundzustand S_0 mit einer Halbwertszeit von 500 fs. Dieses thermische Intermediat, das als J_{625} bezeichnet wird, reagiert in ca. 5 ps weiter zu dem Intermediat K. Da die Generierung des K-Intermediates in wenigen ps geschieht, der Zerfall zum L Intermediat aber im μs Bereich stattfindet, kann dieses Intermediat verglichen mit den

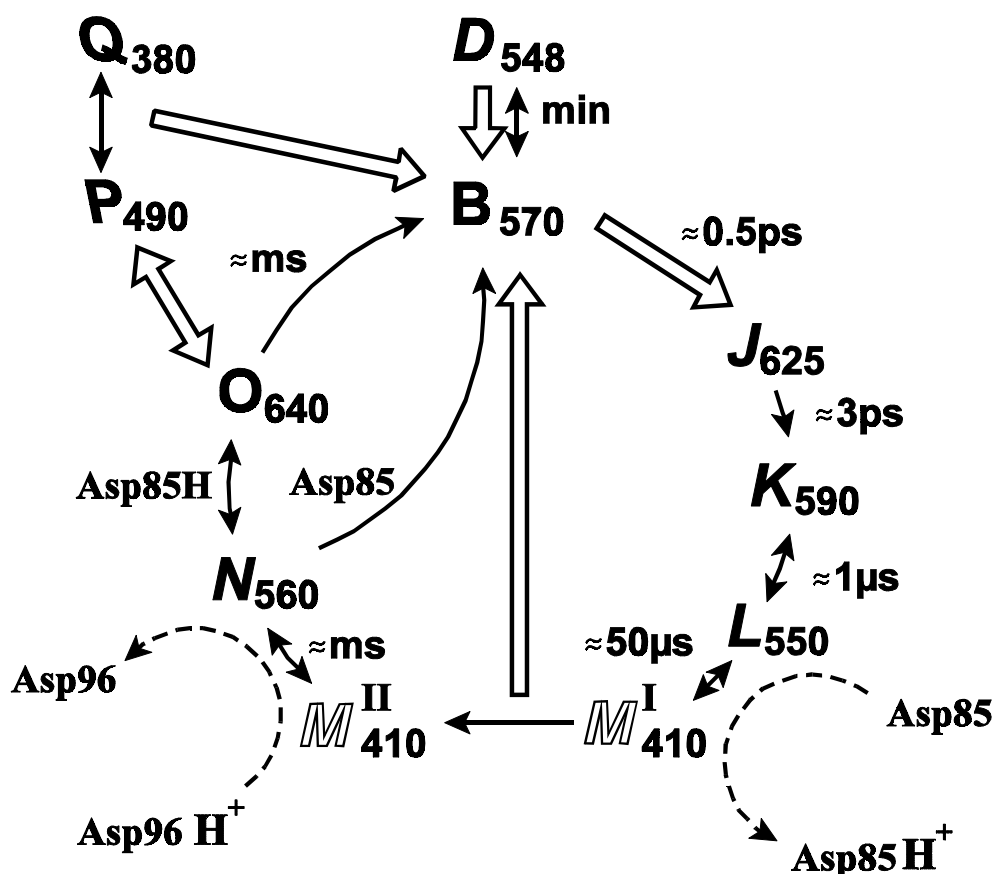


Abb. 2: Photocycluse von Bakteriorhodopsin. Die Intermediate werden mit den üblichen Einbuchstabencodes gekennzeichnet, die durch die Angabe des Absorptionsmaximums näher spezifiziert werden. Photochemische Schritte sind durch dicke Pfeile, thermische durch dünne Pfeile gekennzeichnet. Rechts kursiv gedruckte Intermediate weisen eine 13-*cis* Retinalkonfiguration auf.

vorherigen als langlebig bezeichnet werden. Aufgrund von FTIR-Daten wurde zwischen K und L ein weiteres Intermediat postuliert (KL), das sich aber sonst nicht spektroskopisch von K unterscheidet. Durch FTIR Untersuchungen wurden charakteristische Banden gefunden, die den KL-zu-L Übergang entweder mit Änderungen in der Nähe des β -Ionon oder mit Änderungen in der Nähe der Schiff'schen Base in Zusammenhang bringen.

Im L-Intermediat muß der Protonentransfer von der Schiff'schen Base (SBH) zu D85 vorbereitet werden, was eine starke Wechselwirkung zwischen SBH und D85 impliziert. Diese Wechselwirkung konnte durch NMR nachgewiesen werden. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, daß interne Wassermoleküle an dieser Wechselwirkung beteiligt sind.

Um vektoriellen Protonentransport zu ermöglichen, muß die De- und Reprotonierung der SBH von unterschiedlichen Seiten der Membran geschehen. Das ist der Grund, warum mindestens zwei M-Intermediate postuliert werden müssen [28] (im folgenden als M^I und M^{II} bezeichnet). Der Übergang zwischen diesen Intermediaten, die spektroskopisch nicht zu unterscheiden sind, wird als Schalter bezeichnet. Die molekularen Mechanismen des „Schalters“ werden zur Zeit noch kontrovers diskutiert. Auf der einen Seite ist eine Veränderung im Chromophor Retinal dafür verantwortlich (Rotation der Einfachbindung von 13cis-14cis zu 13cis-14trans Konfiguration), auf der anderen Seite werden Konformationsänderungen im Proteingerüst dafür verantwortlich gemacht (von einer T zu einer C Geometrie). Unstrittig ist dagegen, daß der Übergang von M_I zu M^{II} weitgehend irreversibel ist.

Im weiteren Verlauf des Zyklus zerfällt das M^{II} - zu dem N-Intermediat. Dabei wird ein Proton von D96 zur Schiff'schen Base transportiert. Während seiner Lebensdauer wird N dann von der zytoplasmatischen Seite reprotoniert. Die Retinalkonfiguration im N-Intermediat ist 13-*cis*. Nach der Reprotonierung von D96 findet bei dem Übergang von N zu O die Rückisomerisierung statt (13-*cis* zu all-*trans*), wobei D85 noch protoniert ist. Aus diesem Grund ist eine Akkumulation von O im basischen Milieu nicht möglich. Die Relaxation nach B_{570} erfolgt dann direkt aus N_{560} . Im letzten Schritt wird das Proton von D85 zu dem EC „H-bonded network“ abgegeben [29] und die Proteinkonfiguration erreicht den ursprünglichen Ausgangszustand.

2.4 Technische Anwendungen von Bakteriorhodopsin

Die potentiellen technischen Anwendungen von Bakteriorhodopsin wurden schon früh erkannt. Die für BR bisher aufgezeigten Anwendungen sind in der folgenden *Tabelle 2* zusammengefaßt. Da der Protonentransport durch die Membran mit dem Photozyklus verknüpft ist, in dessen Verlauf das stark hypsochrom verschobene M-Intermediat gebildet wird, nehmen optische Anwendungen, die die Photochromie des Materials ausnutzen, eine herausragende Position ein [4].

Dabei steht besonders die Reversibilität des Materials im Vordergrund, da sie in Kombination mit der hohen Quantenausbeute und der Lichtempfindlichkeit von synthetisch organischen Materialien bisher unerreicht ist. Die Reversibilität des Materials kommt besonders bei Anwendungen wie wiederbeschreibbaren Bildschirmen und der holographischen Interferometrie zum tragen.

Tabelle 2: Mögliche technische Anwendungen von Bakteriorhodopsin [4]

Ladungstransport	Photochrom
<ul style="list-style-type: none"> ▶ ATP-Generation in Reaktoren ▶ Seewasserentsalzung ▶ Solarzelle 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Informationsspeicherung ▶ 2-D Speicherung [30, 31] ▶ 3-D Speicherung ▶ Holographischer Speicher [32] ▶ Assoziative Speicher
<p>Photoelektrisch</p> <ul style="list-style-type: none"> ▶ Ultraschnelle Lichtdetektion [35] ▶ Künstliche Retinas ▶ Bewegungsdetektoren 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Informationsverarbeitung ▶ Optischer Schalter [33] ▶ Optische Filterung ▶ Signalbearbeitung ▶ Neuronale Netze ▶ Räumliche Lichtmodulatoren [34] ▶ Phasenkonjugation ▶ Mustererkennung ▶ Interferometrie
<p>Verschiedenes</p> <ul style="list-style-type: none"> ▶ Frequenzverdopplung ▶ Strahlungsdetektor ▶ Biosensoren ▶ etc. 	

2.5 Modifikationsmöglichkeiten

Die Natur hat in einer Jahrmillionen dauernden Evolution den Protonentransport durch die Membran optimiert, d.h. der Photozyklus, in dessen Verlauf Protonen durch die Membran gepumpt werden, soll mit einer hohen Frequenz durchlaufen werden. Wird bei einer Anwendungen, wie z.B. der holographischen Interferometrie, die Photochromie des Materials ausgenutzt, ist eine lange M-Lebensdauer und damit eine niedrige Pumpfrequenz wünschenswert. Deshalb ist es bei diesen technischen Anwendungen notwendig die Eigenschaften von BR-Systemen zu beeinflussen.

Die Variation physikalischer und chemischer Parameter ist die einfachste Möglichkeit die Eigenschaften von BR-Systemen zu beeinflussen. Neben Druck [36], Temperatur [37], elektrischen Feldern [38], chemischen Zusatzstoffen wie z.B. Azid und dem Wassergehalt [39] des umgebenden Mediums, hat vor allen Dingen der pH-Wert [40] einen entscheidenden Einfluß auf die photochemischen Eigenschaften von BR.

Daneben besteht die Möglichkeit die Eigenschaften von BR durch biochemische Verfahren, wie z.B. den Austausch des lichtabsorbierenden Retinals durch Retinalanaloge, zu modifizieren [41][43]. Eine gezielte Vorhersage der Eigenschaften des neuen Materials ist dabei aber schwierig, wenn nicht sogar völlig unmöglich.

Am effizientesten, in bezug auf Ausbeute und Vorhersagbarkeit der Eigenschaften, sind gentechnologische Veränderungen der Proteinsequenz. Prinzipiell gibt es mehrere Möglichkeiten, die Proteinsequenz zu beeinflussen.

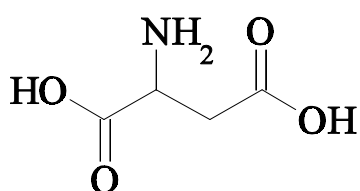
Durch *in vivo* Mutagenese und Selektion von Halobakterienstämmen entstehen BR-Varianten, die in beliebiger Menge gezüchtet werden können. Bei dieser Methode kann der Aminosäureaustausch jedoch nicht genau gesteuert werden [44]. Daneben existiert die Möglichkeit, eine gezielte Punktmutation im Gen über ein Transportsystem in *Halobacterium salinarum* zu exprimieren [45]. D.h. durch den gezielten Austausch bestimmter Aminosäuren in der Proteinsequenz können die Systemeigenschaften von BR optimiert werden.

Die einfach mutierten Systeme werden üblicherweise mit den Einbuchstabenkürzeln bezeichnet. Vor der Positionsnummer steht die ursprünglich vorhandene, dahinter die neu eingeführte Aminosäure. Für D96N bedeutet das den Austausch von Asparaginsäure (D) gegen Asparagin (N) an Position 96. In **Abb. 3** sind die beiden Aminosäuren dargestellt, die sich nur in der endständigen, funktionellen Gruppe unterscheiden.

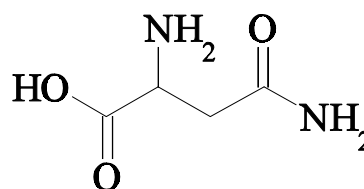
In der vorliegenden Arbeit wurde neben dem Wildtyp (WT) hauptsächlich die Mutante D96N

untersucht.

Diese Variante unterscheidet sich im Gegensatz zu D85E und D85N nur geringfügig in den spektralen Eigenschaften vom BR-WT. Während des Photozyklus werden WT- analoge Intermediate durchlaufen. Allerdings ist die Bildung des O-Intermediates stärker durch den pH-Wert kontrolliert [31]. Weiterhin erhöht sich die Lebensdauer des M-Intermediates, da Asp96 als Protonendonator fungiert. Durch den Austausch der Säuregruppe gegen eine Amidgruppe wird die Schiff'sche Base direkt von der zytoplasmatischen Seite reprotoniert. Dadurch wird die Reaktion von M nach B erheblich verlangsamt, stärker an den pH-Wert des umgebenden Mediums gekoppelt und die Anreicherung des M-Intermediates im photochemischen Gleichgewicht erleichtert [46].



Asparaginsäure
Asp (D)



Asparagin
Asn (N)

Abb. 3: Strukturformel von Asparaginsäure und Asparagin. Durch den Austausch von Asparaginsäure durch Asparagin an Position 96 der Proteinsequenz wird die Mutante D96N erhalten. Der Austausch der Säuregruppe durch eine Säureamid führt dazu, daß die Reprotonierung der Schiff'schen Base und damit die Lebensdauer des M-Intermediates stärker an den pH-Wert des umgebenden Mediums gekoppelt ist.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Chemikalien

3.1.1 Herkunft

Alle Chemikalien wurden von den Firmen Merck KGaA, Darmstadt, Sigma/Aldrich Vertriebs GmbH Deisenhofen oder Roth GmbH & Co, Karlsruhe bezogen, waren mindestens von analytischer Reinheit (p.a.) Sie wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt.

3.1.2 Einstellung der relativen Feuchte

Alle Angaben der relativen Luftfeuchte (rLF) beziehen sich auf eine Temperatur von 20 ° C. Zur deren Einstellung wurde entweder ein Klimaschrank (WTB Binder) oder ein Exsikkator verwendet. Die Einstellung der Feuchte geschah dann mit gesättigten Salzlösungen. Die relative Luftfeuchte wurde in diesem Fall mit einem Hygrometer (ebro, THF 100) gemessen. In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Salzlösungen zusammengefaßt.

Zur Einstellung der relativen Luftfeuchtigkeit wurde die Probe für mindestens 24 h in einer Atmosphäre mit der gewünschten relativen Luftfeuchte equilibriert.

Tabelle 3: Verwendete Salze zur Einstellung der rLF [47][48]

Wäßrige Lösung mit Überschuß von	theoretische rLF [%] bei 20 °C, * bei 25 °C
LiCl	11,3
CaBr ₂	18,5 ± 0,5
KC ₂ H ₃ O ₂	23,1 ± 0,3
CaCl ₂	32,3 ± 0,3
K ₂ CO ₃	43,2 ± 0,3
Mg(NO ₃) ₂	54,4 ± 0,2
CoCl ₂	64,9 ± 3,5*
NaC ₂ H ₃ O ₂	76,0 ± 2,0
KCl	85,1 ± 0,3
K ₂ SO ₄	97,6 ± 0,5

3.2 Bakteriorhodopsin

3.2.1 Herstellung und Reinigung

Sowohl BR-WT als BR-D96N wurde nach einer Standardprozedur [49] hergestellt, und von Herrn Oesterhelt (MPI, Martinsried) freundlicherweise in gereinigter Form zur Verfügung gestellt.

3.2.2 BR-crude

Bei BR-crude handelt es sich um eine noch nicht vollständig gereinigt BR-Suspension. Der letzte Aufreinigungsschritt, die Zuckerdichtegradientenzentrifugation wurde nicht durchgeführt. Dieses Material ist mit weiteren Proteinen verunreinigt und wurde nur zur Herstellung von Druckfarben auf BR Basis verwendet. Im Gegensatz zu sonstigen Experimenten sollten sich die Verunreinigungen dort nicht störend bemerkbar machen. Im Vergleich mit vollständig gereinigten BR-Suspensionen zeigt BR-crude bei gleicher Trocknungseinwaage eine um 37 % verringerte optische Dichte.

3.2.3 Lyophilisiertes Bakteriorhodopsin

Die Gefriertrocknung von wäßrigen Purpurmembransuspensionen erfolgte ohne regelbare Druck- und Temperiereinrichtung. Probenvolumen zwischen 10 und 40 ml wurden nach Filtration (5µm Nylon-Filter, Whatman) mit der Spin-Freezing Methode in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die Sublimation des Wassers erfolgte unter dem reduzierten Druck einer Drehschieber-Vakuum-pumpe (RZ5, Vacuubrand) deren maximales Vakuum vom Hersteller mit 2×10^{-4} mbar spezifiziert ist. Unter diesen Bedingungen führte die umgebende Raumtemperatur während der Trocknung leicht zur Überhitzung der Probe. Gleichbleibend gute Ergebnisse wurden mit Verringerung der Abgabe von Sublimationskälte an die Umgebung durch Isolation des Kolbens mit Aluminiumfolie erzielt. Die Trocknungsdauer betrug in Abhängigkeit von Menge und Schichtdicke 6 bis 12 h.

3.3 Bakterielle Transglutaminase

Die bakterielle Transglutaminase aus *Streptovercillium mobaraense* wurde nach dem in [50] beschriebenen Standardverfahren hergestellt und aufgereinigt. Sie wurde von H. L. Fuchsbauer (FH Darmstadt) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Bestimmung der Aktivität wurde in [51] beschrieben.

3.4 Biochemische Methoden

3.4.1 Gelelektrophoretische Analyse von Proteinen

Die analytische Trennung von Proteinen nach ihrer Molmasse erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit einem Tris-Glycin-Puffersystem.

Alle Gelelektrophoresen wurden mit einer Mini-Protean II Apparatur durchgeführt. Die Komponenten wurden entsprechend der aufgeführten Reihenfolge zusammengegeben und durchmischt. Das Trenngel wurde gegossen und für die Dauer der Polymerisation (mind. 45 min) mit Isopropanol überschichtet. Analog erfolgte die Präparation des Sammelgels. Nach Einsetzen der Taschenformer und Polymerisation wurden die Gele sofort verwendet oder maximal einen Tag bei 4°C aufbewahrt. Die proteinhaltenden Proben wurden mit dem für das Gelsystem angegebenen Auftragspuffer versetzt und 10 min bei 80°C denaturiert. Nach Einfüllen des jeweiligen Elektrodenpuffers und Applikation der Proben wurden die Proteine bei einer konstanten Spannung von 200 V aufgetrennt. Mit dem Auslaufen des Bromphenolblaus war die Elektrophorese beendet.

3.4.1.1 Analytische Tris-Glycin-Gele

Tabelle 4: Lösungen für analytische Tris-Glycin Gele [52]

Acrylamidlösung:	29,2 % (w/v)	Acrylamid
	0,8% (w/v)	Bisacrylamid
Elektrodenpuffer:	192 mM	Glycin
	25 mM	Tris-Base
	0,1 % (w/v)	SDS
Auftragspuffer:	4 % (w/v)	SDS
	25 % (w/v)	Glyzerin
	25% (w/v)	Harnstoff
	0,01 % (w/v)	ges. Bromphenolblaulsg.

Tabelle 5: Gelzusammensetzung

Komponente	Trenngel 12,5 %	Sammelgel 5 %
Acrylamidlösung	5 ml	1,3 ml
1 M Tris-HCl pH 8,9	4,5 ml	-
1 M Tris-HCl pH 6,8	-	1 ml
Wasser	2,2 ml	5,5 ml
20 % (w/v) SDS	60 µl	40 µl
TEMED	10 µl	10 µl
10 % (w/v) APDS	50 µl	50 µl

3.4.1.2 Protein-Molekulargewichtsstandards

Zur Abschätzung der Molmasse elektrophoretisch getrennter Proteine wurde bei jedem Gel auf mindestens einer der Spuren ein Gemisch von Markerproteinen aufgetragen.

Zusammensetzung des SDS-Proteinmarkers (“für die Kapillarelektrophorese”):

Tabelle 6: Molekulargewichtsstandards

Protein	Herkunft	Molmasse [kDa]
Myosin	Kaninchenmuskel	205
β-Galactosidase	<i>Escherichia coli</i>	116
Phosphorylase B	Kaninchenmuskel	97,4
Serumalbumin	Rind	66
Ovalbumin	Hühnerei	45
Carboanhydrase	Rindererythrocyten	29
Trypsininhibitor	Sojabohne	20,1
α-Lactalbumin	Kuhmilch	14,1

3.4.1.3 Proteinfärbungen

Grundsätzlich wurden alle Proteingele mit Silber angefärbt. Die Methode zeichnet sich durch eine niedrige Nachweisgrenze (ca. 10 ng je Proteinbande) und einen hohen Kontrast aus. Das Polyacrylamid-Gel wurde nach der Elektrophorese in eine Schale überführt und wie folgt behandelt (Reagenzienmenge für ein Gel):

Tabelle 7: Färben von SDS-Gelen [53]

Schritt	Verwendete Lösung	Dauer
Fixieren	Ethanol / Essigsäure / Wasser 50 / 12 / 38	mind. 1 h, möglichst ü.N.
Waschen	50 % (v/v) Ethanol	3 x 20 min
Vorbehandeln	0,1 g Natriumthiosulfat in 500 ml Wasser	1 min
Waschen	Wasser	3 x 20 s
Imprägnieren	0,4 g Silbernitrat, 100 µl Formalin in 200 ml Wasser	20 min
Waschen	Wasser	3 x 20 s
Entwickeln	8 g Natriumcarbonat, 100 µl Formalinlg. in 200 ml Wasser	bis zur gewünschten Bandenintensität
Waschen	Wasser	1 x 10 s
Stoppen	Ethanol / Essigsäure / Wasser 50 / 12 / 38	2 min

Abschließend wurde das Gel mit Wasser gewaschen und dokumentiert.

3.4.2 Sedimentation

Eine Auftrennen von Produktgemischen, bzw. eine Reinigung eines Proteins ist auch mit Hilfe der Ultrazentrifugation möglich. Bei der angewendeten Dichtegradientenzentrifugation werden die Substanzen nach ihrer Schwimmdichte separiert. Zur Erzeugung eines linearen Gradienten wurde ein herkömmlicher Gradientenmischer verwendet. Die Zentrifugation wurde dann in einer Zentrifuge (Centrikon T1080, Kontron) mit einem Swing-out Rotor (TS41.14, Kontron) bei 4°C durchgeführt.

3.5 Physikalische Methoden

3.5.1 Absorptionseigenschaften

Zur Bestimmung der wellenlängenabhängigen Absorptionseigenschaften wurde ein Zweistrahl-photometer (Uvikon922, Kontron) verwendet.

3.5.2 pH-Wert-Messung

Alle pH-Wert Messungen wurden mit einem pH-Meter (Hi 9017, Hanna instruments) bei einer Temperatur von 20°C durchgeführt. Alle Angaben des pH-Wertes bei BR-Schichten und BR Filmen beziehen sich auf den pH-Wert der aufgetragenen Lösung.

3.5.3 Rheologie

Die Rheologie beschreibt das Fließ- und Deformationsverhalten von Stoffen. Diese Materialeigenschaften treten bei Einwirken einer äußeren Kraft auf. Sowohl zur Charakterisierung als auch zur Simulation anwendungstechnischer Prozesse sind rheometrische Untersuchungen geeignet. Besonders im Bereich der Lack- und Druckfarbenentwicklung ist diese Methode unverzichtbar. Einen Überblick über den Einsatz der Rheologie in der Lack- und Druckfarbenentwicklung wird in [54] gegeben. Im Rahmen dieser Arbeit kam ein Rotationsrheometer (RHEO 2000, Fa. Europhysics) mit Kegel-Platte Meßsystem (C50-1) zum Einsatz.

3.6 Charakterisierung von Bakteriorhodopsin-Filmen und Schichten

3.6.1 Einführung

Eine Anwendung mit Bakteriorhodopsin ist nur dann effizient möglich, wenn das System für den jeweiligen Zweck optimiert wurde. Deshalb werden im folgenden Meßverfahren vorgestellt, mit denen es möglich ist, Bakteriorhodopsin unter Anwendungsgesichtspunkten zu charakterisieren. Das Hauptaugenmerk liegt dabei auf der Charakterisierung für die Holographie. Dort spielen insbesondere die Optische Dichte, die Variation der Optischen Dichte über die Fläche, die M-Lebensdauer und die Sensitivität der Filme eine entscheidende Rolle. An die Lebensdauer des M-Intermediates ist das Abklingverhalten des zu rekonstruierenden Hologramms gekoppelt. Die Sensitivität bestimmt die Lichtmenge, die benötigt wird um ein Hologramm einschreiben zu können. Auch sie ist von der M-Lebensdauer abhängig.

3.6.2 Vereinfachter Photozyklus von Bakteriorhodopsin

Der in **Abb. 4** gezeigte vereinfachte Photozyklus (Zwei-Zustandsmodell) von Bakteriorhodopsin, wird oft verwendet wenn die photophysikalischen Eigenschaften für Anwendungen wie z.B. die Holographische Interferometrie beschrieben werden sollen [55]. Dabei wird davon ausgegangen, daß im wesentlichen nur die Intermediate B und M im Laufe der Reaktion akkumulieren. Diese Annahme ist besonders dann sinnvoll, wenn Konzentrationsänderungen betrachtet werden, die sich auf einer Zeitskala größer ist als 100 ms abspielen. In diesem Fall ist die transiente Konzentration aller anderer Intermediate aufgrund ihrer kurzen Lebensdauern zu vernachlässigen [56, 57]. Die Konzentrationen der Intermediate B und M werden durch drei Reaktionskonstanten

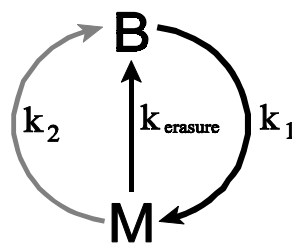


Abb. 4: Vereinfachter Photozyklus von Bakteriorhodopsin. Dieser vereinfachte Photozyklus ist in vielen Fällen ausreichend, um die photophysikalischen Eigenschaften von Bakteriorhodopsin für Anwendungen wie die holographische Interferometrie zu beschreiben.

festgelegt. B reagiert photochemisch zu M, das thermisch und/oder photochemisch nach B zurück reagieren kann. Dabei kann der photochemische Schritt von M nach B vernachlässigt werden, wenn kein blaues Licht ($\lambda < 450$ nm) vorhanden ist.

In **Abb. 5** ist die Änderung der Absorptionseigenschaften nach Anregung mit aktinischem Licht (2 mW/cm^2) exemplarisch für eine BR-D96N Probe dargestellt. Die Pfeile in dem Diagramm deuten den zeitlichen Verlauf der Reaktion an. Das Zeitintervall zwischen zwei Spektren betrug 2 Minuten. Mit zunehmender Reaktionsdauer nimmt die Konzentration an M ab, wohingegen die Konzentration an B zunimmt. Die Differenzspektren weisen einen eindeutigen isosbestischen Punkt bei 450 nm auf. Dieser stimmt mit dem in [58] gefundenen überein und ist ein klares Indiz dafür, daß nur zwei spektroskopisch unterscheidbare Spezies zum absorptiven Verhalten der Probe beitragen. Damit ist experimentell belegt, daß die Annahme des Zwei-Zustandsmodells gerechtfertigt ist. Die Konzentrationen der Intermediate von B und M können dann direkt aus den Spektren (bei der Wellenlänge des jeweiligen Absorptionsmaximums) entnommen werden. Dieses Verfahren ist möglich, weil sich die Absorptionsmaxima um 160 nm unterscheiden und damit gegenseitig nicht merklich beeinflussen.

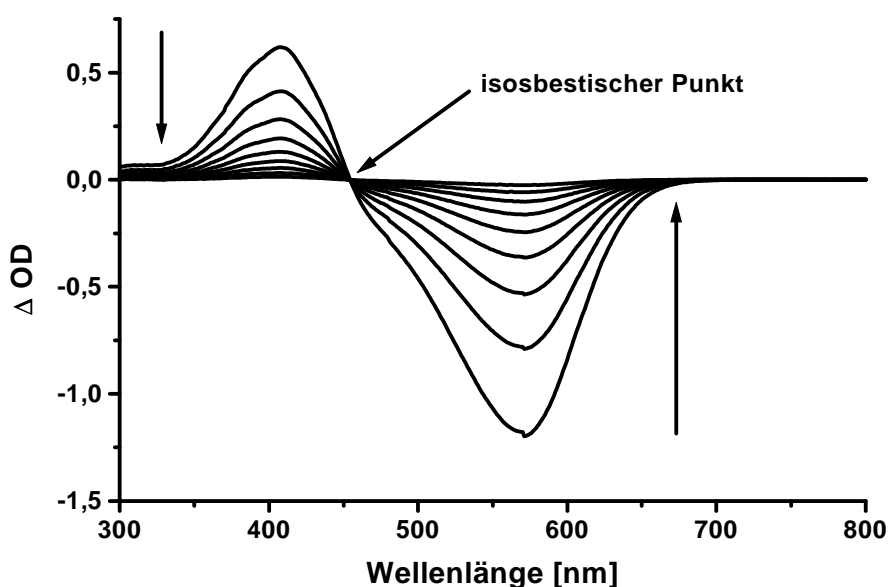


Abb. 5: Differenzspektren für BR-D96N. Die Spektren wurden nach Anregung mit aktinischem Licht aufgenommen. Die Pfeile deuten den zeitlichen Verlauf an. Das Zeitintervall zwischen zwei Spektren betrug 2 Minuten. Die Spektren weisen einen eindeutigen isosbestischen Punkt bei 450 nm auf, was darauf deutet, daß nur zwei unterschiedliche Spezies zum Absorptionsverhalten beitragen.

3.6.3 Meßaufbau

Sollen transiente Absorptionsänderungen mit einer zeitlichen Auflösung im ms Bereich gemessen werden, dann ist die Verwendung eines herkömmlichen Spektrometers (z.B. UVIKON922, Kontron) mit sequentieller Aufzeichnung nicht mehr sinnvoll. Das Problem der sequentiellen Datenaufzeichnung kann mit einem sogenannten Weißlichtspektrometer umgangen werden. Der schematische Meßaufbau eines modifizierten Weißlichtspektrometers zur Messung zeitlicher Absorptionsänderungen ist in **Abb. 6** dargestellt. Das Licht einer Xenon-Hochdrucklampe wird aufgeweitet und kollimiert. Mit einem IR-Filter (KG1, Schott) wird die Intensität im langwelligen Teil des Lampenspektrums reduziert. Damit wird zum einen die Sättigung des Detektors zum anderen eine unerwünschte Erwärmung der Probe vermieden. Der Polarisator dient zum Abgleich der Polarisierungen von Meß- und Anregungslicht. Um die Intensität des Detektionslichtes so weit abzuschwächen, daß eine photochemische Anregung der Probe nicht nachzuweisen ist, können Neutralglasfilter verschiedener OD (Schott) verwendet werden. Das Detektionslicht hat typischerweise eine Intensität von $5 \mu\text{W}/\text{cm}^2$. Nach Passieren der Probe wird das Licht mit einer Linse auf den Eingangsspalt ($100 \mu\text{m}$) eines

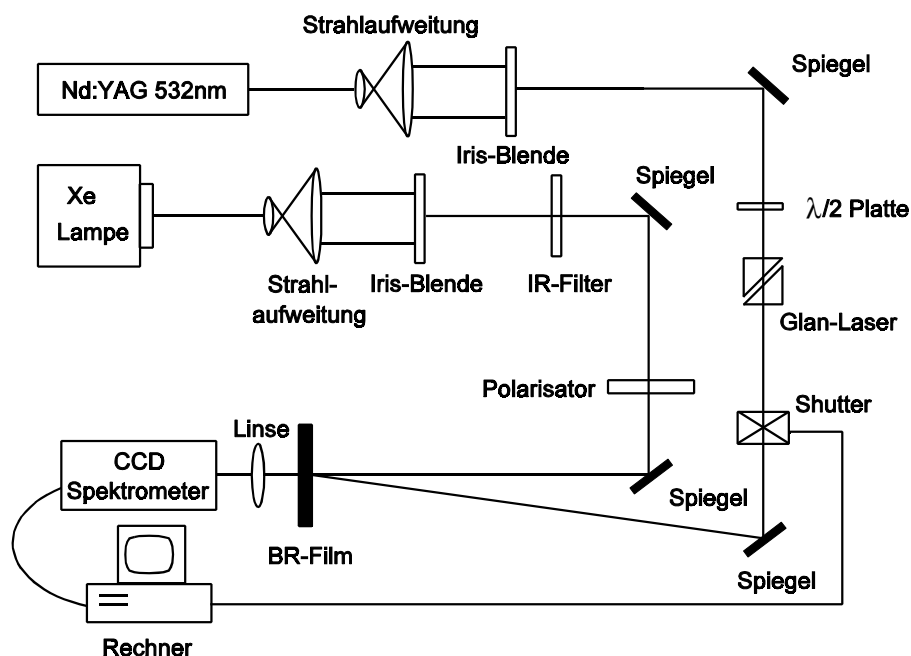


Abb. 6: Schematischer Meßaufbau zur Bestimmung transienter Absorptionsänderungen. Das kollimierte und gefilterte Licht einer Xenon-Hochdrucklampe wird zur Detektion verwendet. Als Detektor dient ein Gitterspektrograph mit einem Diodenarray. Die Anregung der Probe geschieht mit einem frequenzverdoppelten Nd-YAG Laser. Das ganze System wird von einem Rechner gesteuert.

Gitterspektrographen fokussiert. Zur Detektion des Lichtes wird dann ein Diodenarray (Instaspec IV, LOT Oriel, 1024 x 512 Pixel) verwendet. Die Berechnung der Transmission bzw. der OD geschieht mit Hilfe eines Rechners, der gleichzeitig auch den Shutter steuert.

Zur photochemischen Anregung der Probe wurde ein Nd-YAG-Laser verwendet (DPSS200, Coherent). Dessen Licht wurde aufgeweitet und kollimiert. Zur Einstellung der Intensität des aktinischen Lichtes wurde eine Kombination aus einem Glan-Laser Prisma und einer $\lambda/2$ Platte verwendet. Das Anregungslicht wird mit dem Detektionslicht in der Probenebene zur Deckung gebracht.

Zur Bestimmung der Leistung des Anregungslichtes wurde eine kalibrierte Photodiode verwendet (Model 835, Newport).

3.6.4 Meßgrößen

Legt man das einfache Zwei-Zustandsmodell zugrunde, dann ist die photochemische Reaktionsrate k_1 abhängig von der Wellenlänge und der Intensität des aktinischen Lichtes, d.h.

$k_1 = k_1(I, \lambda) := \alpha \cdot I$. Mit $\epsilon_B(570 \text{ nm}) = 63,000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\Phi_{B-M} = 0.64$, der Wellenlänge $\lambda = 570 \text{ nm}$ und der Intensität I in mW/cm^2 (und dem Umrechnungsfaktor auf Einstein) gilt:

$$k_1 = 2303 \cdot \epsilon_B \cdot \Phi_{B-M} \cdot 8,35 \cdot 10^{-12} \cdot \lambda \cdot I = 0,44 \cdot I \text{ [1/sec]} \quad (1)$$

erhält man $\alpha_{570} = 0.44$. Für die häufig verwendete Wellenlänge $\lambda = 532 \text{ nm}$ ergibt sich mit den Konstanten $\epsilon_B(532 \text{ nm}) = 42,000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\Phi_{B-M} = 0.64$, $\alpha_{532} = 0.275$.

Diese Formel gilt allerdings nur für den Fall, daß die Anzahl der Photonen groß gegenüber der Anzahl der BR-Moleküle ist. Ist diese Annahme nicht mehr gerechtfertigt, dann wird die folgende Formel zur Abschätzung der photochemischen Reaktionsrate herangezogen:

$$k_{h\nu} = \frac{(1 - T) \cdot N_{\text{Photonen}} \cdot \Phi}{c_{BR}} \quad (2)$$

Hierin ist T die Transmission der Probe bei der Wellenlänge des aktinischen Lichtes, N die Anzahl der Photonen in Einstein, Φ die Quantenausbeute der Photoreaktion und c_{BR} die Anfangskonzentration an BR. Zur Berechnung wird die Anzahl der absorbierten Photonen mit der Quantenausbeute multipliziert und durch die Anfangskonzentration an BR-Molekülen geteilt. Bei dieser Betrachtung wird vernachlässigt, daß sich die Transmission der Probe mit der Zeit ändert. Daß die Formel trotzdem dazu geeignet ist, die photochemische Reaktionskonstante in erster Näherung abzuschätzen wird in **Abb. 7** verdeutlicht. Dort ist der Vergleich zwischen der

nach (2) berechneten Reaktionsrate mit der nach einem modifizierten Schichtenmodell berechneten Reaktionsrate zu sehen. Zur dieser Berechnung der Reaktionsrate wurde das bestehende Schichtenmodell für den stationären Zustand [59] so modifiziert, daß die zeitliche Änderung der Transmission ebenfalls berücksichtigt wird. Die Probe wird dazu in infinitesimal kleine Schichten unterteilt. Die Transmission wird dann für jede Schicht rekursiv berechnet.

Aus den berechneten Kurven konnte die Reaktionsrate durch eine Kurvenanpassung ermittelt werden. In **Abb. 7** sind die Ergebnisse für eine Probe exemplarisch dargestellt. Die OD der Probe wurde zwischen 0,01 und 5 variiert. Die Intensität des aktinischen Lichtes ($\lambda=532$ nm) betrug 1 mW/cm^2 und die Lebensdauer des M-Intermediates betrug 10 s ($k_2=0.1$). Aus der Abbildung geht hervor, daß die Unterschiede zwischen der abgeschätzten Reaktionsrate und der nach dem Schichtenmodell berechneten Reaktionsrate sehr gering sind. Lediglich bei hohen BR-Konzentrationen OD ($OD > 2$) nehmen die Abweichungen zu.

Die Reaktionsrate k_2 von M nach B ist indirekt proportional zur M-Lebensdauer, d.h. $k_2 = 1/\tau_M$. Da die Lebensdauer von M temperaturabhängig ist, muß die Temperatur während der Experimente konstant gehalten werden. B_0 ist die Gesamtkonzentration an BR und im Zwei-

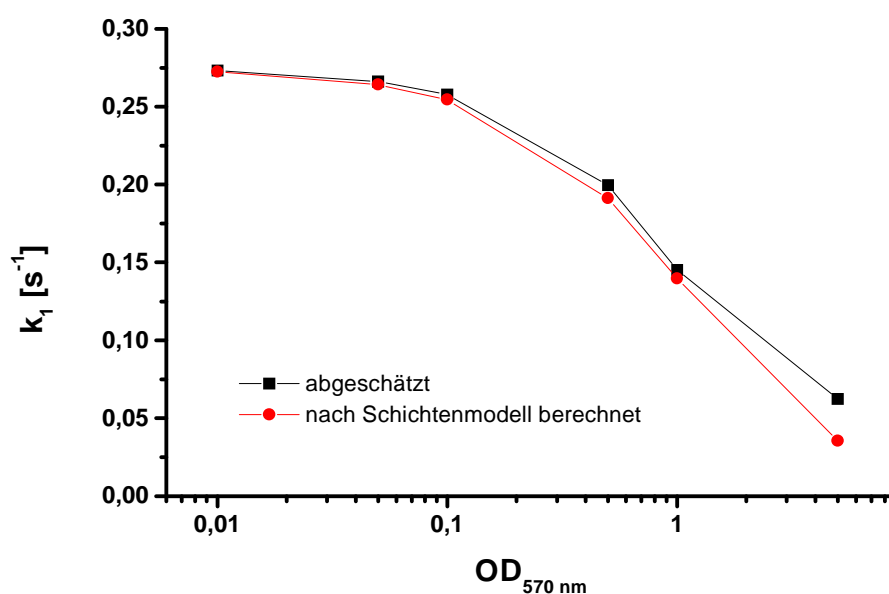


Abb. 7: Vergleich unterschiedlich berechneter Reaktionsraten. Es werden die Reaktionsraten verglichen, die auf zwei unterschiedliche Weisen berechnet worden sind. Zum einen wurde die Reaktionsrate nach (2) abgeschätzt, zum anderen wurde sie nach einem modifizierten Schichtenmodell berechnet. Für das exemplarisch gezeigt Beispiel ($\lambda=532$ nm; $I=1 \text{ mW/cm}^2$; $k_2=0,1$) wurde zwischen beiden Berechnungen eine gute Übereinstimmung gefunden.

Zustandsmodell gilt $B_0 = B(t) + M(t)$.

Für die zeitabhängige Bleichung des Materials erhält man folgende Gleichung:

$$B(t) = B_0 \cdot \frac{k_2 + k_1 \cdot \exp^{-(k_1 + k_2) \cdot t_R}}{k_1 + k_2} \quad (3)$$

Nach Abschalten des aktinischen Lichtes kehrt M thermisch zu B zurück. Dieser Sachverhalt kann mit folgender Formel beschrieben werden

$$M(t_D) = M_{SS}(I) \cdot \exp^{-k_2 \cdot t_D} \quad (4)$$

darin ist t_D die Zeit nach Abschalten des aktinischen Lichtes. Der zeitabhängige Anstieg und Abfall von B und M ist durch folgende Formeln gekennzeichnet.

<i>Anstieg</i>	<i>Abfall</i>
$B(t_R) = B_{SS} + M_{SS} \cdot \exp^{-(k_1 + k_2) \cdot t_R}$	$B(t_D) = B_0 - M_{SS} \cdot \exp^{-k_2 \cdot t_D}$
$M(t_R) = M_{SS} - M_{SS} \cdot \exp^{-(k_1 + k_2) \cdot t_R}$	$M(t_D) = M_{SS} \cdot \exp^{-k_2 \cdot t_D}$

B_{SS} und M_{SS} spiegeln die Konzentrationen von B und M im quasi-stationären Zustand wieder.

$$B_{SS} = B_0 \cdot \frac{k_2}{k_1 + k_2} ; \quad M_{SS} = B_0 \cdot \frac{k_1}{k_1 + k_2} \quad (6)$$

Das intensitätsabhängige Verhältnis γ von B und M ist damit:

$$\gamma := \frac{M_{SS}}{B_{SS}} = \frac{k_1}{k_2} = \alpha \cdot I \cdot \tau_M \quad (7)$$

und ist direkt proportional zu dem wellenlängenabhängigen Faktor α , der Intensität des Lichtes und der M-Lebensdauer. Dieser Zusammenhang unterstreicht die Bedeutung der M-Lebensdauer, denn eine Anstieg der Lebensdauer erlaubt es, die Intensität um den gleichen Faktor zu vermindern um den gleichen γ -Wert zu erhalten.

Das Bleichverhältnis R_B , das den Anteil der von B nach M konvertierten BR Moleküle angibt, ist nur von γ abhängig.

$$R_B := \frac{B_0 - B_{SS}}{B_0} = 1 - \frac{1}{1 + \alpha \cdot I \cdot \tau_M} = \frac{\gamma}{1 + \gamma} \quad (8)$$

Die anfängliche iS Sensitivität des Materials ist die intensitätsabhängige Änderung der Populationsdichte von B, extrapoliert auf $t_R \rightarrow 0$.

$$iS := \left. \frac{dB}{dI} \right|_{t \rightarrow 0} = \frac{\gamma^2}{(1 + \gamma)^2} \cdot \frac{1}{I} = R_B^2 \cdot \frac{1}{I} \quad (9)$$

Die anfängliche Sensitivität iS wird hauptsächlich von der M-Lebensdauer bestimmt, je größer τ_M wird, desto größer wird auch iS .

Die Anfangssensitivität beschreibt das Verhalten zu einer Zeit, zu der BR wie ein herkömmliches nicht-reversibles Material, wie z.B. eine Silberhalogenidschicht behandelt werden kann. Bis zum Erreichen des quasi-stationären Zustands nimmt die Sensitivität kontinuierlich ab. Der zeitliche Verlauf ist sehr komplex. Ein zugänglicherer Parameter ist die Lichtenergie, die benötigt wird um 50 % der maximal erzielbaren Bleichung zu erreichen. Sie wird im folgenden E_{50} genannt. Die Zeit die zur Erzielung von 50 % Bleichung benötigt wird, d.h. $B_{50} = \frac{1}{2}(B_0 + B_{SS})$ ist durch folgende Gleichung gegeben:

$$t_{50} = \frac{\tau_M \cdot \ln 2}{1 + \gamma} \quad (10)$$

Da die Intensität während der Belichtung nicht variiert wurde ergibt sich für E_{50} :

$$E_{50} := I \cdot t_{50} = \frac{I \cdot \tau_M \cdot \ln 2}{1 + \gamma} = \frac{\gamma}{1 + \gamma} \cdot \frac{\ln 2}{\alpha} = \frac{\ln 2}{\alpha} \cdot R_B \quad (11)$$

Die Zeit, die benötigt wird, τ_{50} um thermisch zu 50% von M_{SS} zu gelangen ist mit der M-Lebensdauer folgendermaßen verknüpft:

$$\tau_{50} = \tau_M \cdot \ln 2 \quad (12)$$

Zur Untersuchung der Kinetik wurden oft Differenzspektren herangezogen. Deshalb wurden zwei weitere Größen definiert. Die erste ist M_{decay} , und beschreibt den Zerfall der M-Population bezogen auf die ursprüngliche M-Population. In Analogie dazu wird die sogenannte $B_{recovery}$ definiert, die die Repopulation von B beschreibt.

$$\begin{aligned} M_{decay} &:= \frac{\Delta M(t_D)}{\Delta M(\max)} = \frac{M(t_D)}{M_{SS}(\gamma)} \\ \text{und} \quad B_{recovery} &:= \frac{\Delta B(t_D)}{\Delta B(\max)} = - \frac{B(t_D) - B_0}{B_{SS}(\gamma) - B_0} \end{aligned} \quad (13)$$

Im Zwei-Zustandssystem sollte eine Auftragung von $B_{recovery}$ gegen M_{decay} eine Gerade mit einer negativen Steigung von 1 ergeben, da die Zeitabhängigkeit von M_{decay} und $B_{recovery}$ gleich sind.

$$\frac{dM_{decay}}{dt} = \frac{dB_{recovery}}{dt} = -k_2 \cdot \exp^{-k_2 \cdot t_D} \quad (14)$$

Die zuvor getroffenen Definitionen sind in der folgenden *Tabelle 8* zusammengefaßt. Diese Zusammenstellung macht deutlich, daß die M-Lebensdauer eine zentrale Rolle bei der Charakterisierung von BR-Systemen im Hinblick auf eine Anwendung hat. Zu beachten ist allerdings, daß die Gültigkeit der abgeleiteten Größen an die Gültigkeit des Zwei-Zustandsmodells gekoppelt ist.

Tabelle 8: Größen zur Charakterisierung von BR-Filmen und Schichten

	Größe	Abkürzung	Abhängigkeit
Film	Optische Dichte	B_0	
Präparation	M-Lebensdauer	τ_M	
Experiment	Intensität	I	
	Wellenlänge	λ	
Anwendungs Parameter	Bleichungsgrad	R_B	$= \gamma / (1+\gamma)^{\ddagger}$
	Anfangsensitivität	iS	$\sim R_B^2 / I$
	„exposure required“	E_{50}	$\sim R_B$
	Anstiegszeit	t_{50}	$\sim R_B / I$
	Kontrastabfallzeit	τ_{50}	$\sim \tau_M$

\ddagger : γ -Wert ist proportional zum Produkt aus Intensität und M-Lebensdauer: $\gamma \sim I \cdot \tau_M$

3.7 Herstellung von Bakteriorhodopsin Filmen und Schichten

3.7.1 Einführung

Soll BR in einer technischen Anwendung eingesetzt werden, dann kommt der Immobilisation der PM-Fragmente eine entscheidende Bedeutung zu. Gerade in optischen Anwendungen ist die Unterbindung der Diffusion, bzw. der Rotationsdiffusion unumgänglich, da sie die eingeschriebenen Informationen zerstören [60]. Bei der Immobilisation der PM kann auf verschiedene wasserlösliche Polymere zurückgegriffen werden.

Wird im folgenden von einer BR-Schicht gesprochen, dann ist das eine Mischung aus PM und Hilfsstoffen eingebettet in ein Matrixmaterial, das auf ein Substrat aufgebracht wurde. Von einem Film wird immer dann gesprochen, wenn die Schicht durch Versiegelung, z.B. mit einer weiteren Glasplatte, zusätzlich geschützt ist. Ein Vorteil von Filmen ist, daß die lichtempfindliche Schicht vor Umwelteinflüssen, wie z.B. Veränderungen in der relativen Luftfeuchte geschützt ist und daß die Versiegelung einen Schutz vor mechanischer Zerstörung darstellt.

3.7.2 Matrixmaterial

Gelatine ist das meist-benutzte Material, natürlichen Ursprungs, das zur Stabilisation von empfindlichen Substanzen, wie z.B. Vitaminen, pharmazeutischen Wirkstoffen oder Enzymen eingesetzt wird. Sogar ganze Zellen konnten schon in einer Gelatinematrix immobilisiert werden [61-64]. Mit ein Grund dafür sind die einzigartigen Eigenschaften von Gelatine-lösungen, die ein thermisch reversibles Netzwerk unter der Sol-Gel-Temperatur von ca. 30 °C ausbilden [65][66]. Während der Gelbildung können die gewünschten Verbindungen zwischen den Protein-Strängen eingebunden werden. Daneben wird Gelatine auch in der Photographie seit Anfang dieses Jahrhunderts zur Herstellung von photographischen Schichten (Silberhalogenid) eingesetzt [67].

Deshalb lag es nahe, Gelatine bei der Herstellung von BR-Filmen und Schichten, die in optischen Anwendungen genutzt werden sollen, zu verwenden[68].

Alle im folgenden beschriebenen Filme und Schichten, die in der Optik zum Einsatz kamen, wurden mit Gelatine als Matrixmaterial hergestellt. Dabei wurde ausschließlich Photogelatine (Stöss AG) verwendet.

3.7.3 Einstellung der Protonenverfügbarkeit

Ein zentraler Aspekt bei der Filmherstellung ist die reproduzierbare Einstellung der Protonenverfügbarkeit, denn darüber kann die Reprotonierung der Schiff'schen Base, oder anders ausgedrückt die Lebensdauer des M-Intermediates beeinflusst werden. Die Protonenverfügbarkeit ist abhängig von der Beweglichkeit der Protonen im Matrixmaterial und der Anzahl der im Material verfügbaren Protonen. Die Anzahl der verfügbaren Protonen im Matrixmaterial kann über den pH-Wert der Mischung aus BR und dem Matrixmaterial eingestellt werden. Die Beweglichkeit der Protonen ist direkt nicht zu beeinflussen, möglicherweise korreliert sie mit dem Trocknungsgrad der Probe.

Bei dem bisherigen Filmherstellungsverfahren wurde der pH-Wertes der BR/Gelatinemischung folgendermaßen eingestellt:

- Erhitzen der BR-Gelatinemischung auf 65°C
- Messen des pH-Wertes mit einer Elektrode
- Einstellung des pH-Wertes mit 0,5 N NaOH

Dieses Verfahren beinhaltet Unwägbarkeiten, die eine reproduzierbare Einstellung der Protonenverfügbarkeit im Film nicht gewährleisten können.

Die Gründe sollen im folgenden kurz dargelegt werden:

- Temperaturabhängigkeit der Meßmethode, die Messung ist nur mit Temperaturabgleich über einen Temperaturfühler möglich.
- Temperaturabhängigkeit des pH-Wertes, der pH-Wert bei 65°C entspricht nicht dem pH-Wert bei RT.
- Hohe Viskosität der Mischung beeinflusst die Messung
- Keine Pufferwirkung des Systems vorhanden

Aufgrund der beschriebenen Nachteile des Systems wurde versucht die Einstellung des pH-Wertes zu modifizieren. Die Einstellung des pH-Wertes der Mischung erfolgte nicht mit NaOH sondern mit Aminosäuren. Der Vorteil der Aminosäuren ist im Vergleich mit herkömmlichen Puffern die unbegrenzte Verträglichkeit mit dem Matrixmaterial Gelatine. Desweiteren zeichnen sich Aminosäuren durch eine Pufferwirkung aus. Durch Kombinationen von Aminosäuren ist es möglich, eine Pufferwirkung in jedem gewünschten pH-Bereich zu erzielen.

3.7.4 Gießverfahren

Das bestehende Verfahren zur Herstellung runder Filme und Schichten mit einem Durchmesser von 22,4 mm wurde fortgesetzt. Zur Herstellung flächenunlimitierter Filme war dieses Verfahren allerdings ungeeignet.

3.7.5 Filmaufziehverfahren

Zur Herstellung flächenunlimitierter Filme wurde ein Standardfilmaufziehgerät (Byk Gardener) verwendet. Dazu wird PM in gefriergetrockneter Form in einer Gelatinelösung gelöst und filtriert (Whatmann, Nylon 5µm). Mit den zuvor beschriebenen Aminosäuren wird der gewünschte pH-Wert eingestellt. Die Mischung wird auf dem Substrat (BK7-Glasplatte, Hellma), mit einer Rakel verteilt. Da die Größe des Filmes variabel sein sollte konnte keine kommerziell erhältliche Rakel verwendet werden, d.h. es mußte selbst eine Rakel³ entwickelt werden.

Durch die Entwicklung dieses Filmaufziehverfahrens war die Grundlage zur Herstellung flächenunlimitierter Filme gelegt.

³Herstellung und Entwicklung der Rakel wurde mit Hilfe der Feinmechanischen Werkstatt im Institut für Phys. Chemie, Kernchemie und Makromolekulare Chemie durchgeführt.

4 ENZYMATISCHE QUERVERNETZUNG VON BAKTERIORHODOPSIN

4.1 Einleitung

Für technische Anwendungen von Bakteriorhodopsin wie Entsalzung von Meerwasser [69] oder Umwandlung von Sonnenlicht in Elektrizität [70][71] wird nach Möglichkeiten gesucht, wie Bakteriorhodopsin in membrangebundener Form vernetzt werden kann. Auch bei optischen Anwendungen (Frequenzverdopplung) sind vernetzte PM-patches, die einen trägerfreien Film bilden von großem Interesse.

Dabei kann entweder auf herkömmliche bifunktionale Reagenzien wie Glutardialdehyd zurückgegriffen werden oder das Proteingerüst von Bakteriorhodopsin kann funktionalisiert werden. Nachteile der bifunktionellen Reagenzien sind unerwünschte Nebenreaktionen (z.B. Reaktion mit der Schiff'schen Base) und mangelnde Spezifität. D.h., es treten z.B. gleichzeitig Reaktionen zwischen zwei BR-Molekülen in einer PM (intramembrane Reaktion) und Reaktionen zwischen zwei Molekülen in verschiedenen Membranen (intermembrane Reaktion) auf [72]. Das sehr schwer zu trennende Produktgemisch führt zu einem heterogenen Material, was einen Einsatz in einer technischen Anwendung erschwert. Weiterhin ist die Ausbeute der Reaktionen oft sehr schlecht und es besteht das Problem, die Reaktion zu einem gewünschten Zeitpunkt zu stoppen, weil das reaktive Agens nicht oder nur sehr schwer aus dem Reaktionsgemisch zu entfernen ist. Auch nach Beendigung der Reaktion muß eine Aufreinigung erfolgen, damit eine Weiterreaktion ausgeschlossen werden kann.

Auf der anderen Seite besteht die Möglichkeit, das Molekül zu funktionalisieren, z.B. durch Kopplung mit einem Linkermolekül, das an einem gewünschten Substrat angebunden werden kann. Geschieht diese Funktionalisierung auf herkömmlich biochemischen Weg, dann treten die gleichen Nachteile wie bei der Verwendung von Quervernetzungsreagenzien auf. Mit funktionalisierten Molekülen, die durch gentechnischen Veränderungen zugänglich sind, können die Nachteile herkömmlicher chemischer Reaktionen umgangen werden. Jedoch ist zur Entwicklung des Materials ein zeitaufwendiges, Mehrstufenverfahren [73] notwendig. Wünschenswert wäre demzufolge ein Verfahren zur Quervernetzung, das zum einen selektiv und zum anderen einfach und nicht zeitaufwendig ist. Zur Lösung dieses Problems bieten sich enzymatische Verfahren an.

Eine Gruppe von Enzymen, die sich durch ihre Fähigkeit auszeichnet stabile Querbrücken

zwischen Proteinen aufzubauen, sind die sogenannten „Transglutaminasen“ [74]. In einer zweistufigen Reaktion katalysieren sie die Verknüpfung von Glutamin mit Lysin. Zuerst wird die Carbonsäureamidbindung der Seitenkette eines Glutamins durch die Thiolfunktion eines Cysteinrestes im aktiven Zentrum des Enzyms gespalten. Unter gleichzeitiger Freisetzung von Ammoniak, der unter physiologischen Bedingungen zum Ammoniumion protoniert wird, bildet sich ein kovalentes Intermediat, der sogenannte Acyl-Enzymkomplex aus. Die Wiederherstellung der Carbonsäureamidbindung erfolgt im zweiten Reaktionsschritt durch Übertragung der primären Aminfunktion einer Lysinseite auf die reaktive Zwischenstufe. Unter der Voraussetzung, daß die Lysinaminosäure Bestandteil eines anderen Proteins ist, resultiert eine Vernetzung der Eiweißkörper. Die Transglutaminase wird zurückgebildet und steht für weitere Reaktionen zur Verfügung.

Säugertransglutaminasen eignen sich, wegen ihrer aufwendigen Reinigung, ihrer eingeschränkten Verfügbarkeit, vor allem aber aufgrund ihrer mangelnden Stabilität und geringen Akzeptanz von Substratproteinen nur bedingt für Quervernetzungsreaktionen. Daneben besteht aber die Möglichkeit der Verwendung einer bakteriellen Transglutaminase (BTGase) aus *Streptovorticillium mobaraense*. Sie ist vergleichsweise leicht zu reinigen, zeichnet sich durch eine hohe Stabilität aus und kann in nahezu beliebigen Mengen produziert werden [75]. Ferner sind für ihre Funktionsweise, im Gegensatz zu Säugertransglutaminasen, keine Cofaktoren notwendig [76].

Deshalb sollte im folgenden untersucht werden, ob es möglich ist Bakteriorhodopsin mit BTGase zu vernetzen. Dabei wurde auf zwei Methoden zurückgegriffen. Mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophores (SDS-PAGE) sollte untersucht werden, ob BTGase membrangebundene BR-Moleküle kovalent (!) miteinander verknüpfen kann. Durch die Ultrazentrifugation sollte im Falle einer Reaktion nachgewiesen werden, ob die Reaktion zwischen zwei unterschiedlichen Patches stattfindet oder ob zwei BR-Moleküle eines Patches verknüpft werden.

4.2 Ergebnisse

Alle Reaktionen zwischen BR in membrangebundener Form (PM) wurden entweder in Tris-Puffer pH 7.0 (50 mM) oder in Phosphatpuffer pH 7.0 (50 mM) in kommerziell erhältlichen Eppendorff-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Dazu wurde gefriergetrocknete PM in Puffer gelöst, filtriert (Whatman, Nylonfilter 5 µm) und mit einer BTGase Lösung versetzt. Die Reaktion wurde dann bei 37°C inkubiert.

In **Abb. 8** ist die SDS-PAGE nach Silberfärbung der Reaktionen zwischen PM and BTGase bei pH 7 in 50 mM, Tris Puffer gezeigt. Die Konzentration an PM betrug 1 mg/ml und die Konzentration an BTGase wurde so eingestellt, daß sich eine Aktivität von 3,7 U/ml ergab. Die Proben wurden für unterschiedliche Zeiten (0-120 Minuten) bei 37°C inkubiert. Nach der gewünschten Zeit wurde die Reaktion durch Zugabe von SDS-Auftragspuffer und Erhitzen der Probe auf 80°C (10 Minuten) gestoppt.

In B ist eine Kontrollprobe aufgetragen, die nur BR enthält. In c-f sind Reaktionen von BR-WT



Abb. 8: SDS-PAGE nach Silberfärbung für Reaktion von PM mit BTGase. Die Reaktionsmischungen von BR-WT und BR-D96N bei pH 7.0 (50 mM) und verschiedenen Inkubationszeiten (C+G=0 min.; D+H=10 min.; E+I=20 min., F+J=120 Min.). In c-f sind die Reaktionsansätze für BR-WT und in g-j die Reaktionsansätze von BR-D96N aufgetragen. Die PM Konzentration betrug 1 mg/ml und die Konzentration der BTGase wurde so eingestellt, daß sich eine Aktivität von 3.7 U/ml ergab. In beiden Fällen ist mit steigender Reaktionsdauer eine Zunahme von polymeren Reaktionsprodukten sichtbar.

und in g-h die Reaktionen von BR-D96N für 0, 10, 20, 120 Minuten gezeigt. Prinzipiell ist zwischen BR-WT und BR-D96N kein Unterschied festzustellen. Diese Tatsache ist nicht weiter verwunderlich, da sie sich durch unterschiedliche Aminosäuren an Position 96 unterscheiden, die in der Nähe des Ionenkanals zu finden ist und für die Reaktion nicht zugänglich sein sollte. Zu Beginn der Reaktion (C+G) werden nur zwei Banden gefunden, die BR ($M_w=27$ kDa) und BTGase ($M_w=38$ kDa) zugeordnet werden können.

Nach 20 minütiger Reaktionsdauer (E+G) werden neben diesen Banden zwei weitere Banden gefunden. Eine Abschätzung des Molekulargewichts ergibt $M_w=42$ kDa und $M_w=63$ kDa. Nach zwei Stunden Reaktionsdauer nimmt die Intensität dieser Banden wieder ab. Gleichzeitig findet man in der Nähe des Sammelgels Banden, die einem hochmolekularen Reaktionsprodukt entsprechen. Da BTGase nicht mit sich selbst reagiert, können diese Befunde nur erklärt werden, wenn von einer Reaktion von BR mit BTGase ausgegangen wird. Das scheinbare Molekulargewicht von BR in SDS-Gelen wird mit $M_w=20000$ D angegeben [77], so daß die beiden Banden bei $M_w=42$ kDa und $M_w=63$ kDa als Dimere, bzw. Trimere von BR interpretiert werden können. Da die Proben zur Analyse auf dem Gel denaturiert werden müssen ist es mit dieser Methode nicht möglich zu entscheiden ob eine Reaktion intermembran oder intramembran stattgefunden hat. Um diesen Sachverhalt zu untersuchen wurde ein weiteres Experiment durchgeführt.

Es wurde die Reaktion von BR-WT und der Mutante D96N/D85N mit BTGase untersucht; wobei die Auftrennung der Reaktionsprodukte mit Dichtegradientenzentrifugation vorgenommen wurde. Die Mutante D96N/D85N wurde ausgewählt, weil sie im Grundzustand eine andere Farbe (blau, $\lambda_{max}=605$ nm) als BR-WT (violett, $\lambda_{max}=570$ nm) besitzt. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß sie auf einem linearen Zuckergradienten (37.5 % bis 42.4 %) ein anderes Laufverhalten als BR-WT zeigte. Das waren die Voraussetzungen, um zu entscheiden, ob die Reaktion mit BTGase intermembran oder intramembran erfolgt. Im ersten Fall sollte mindestens eine weitere Bande zu detektieren sein, die eine andere Farbe, besser gesagt einer Mischfarbe aus BR-WT und BR D96N/D85N besitzt.

Das Ergebnis des Experimentes nach Dichtegradientenzentrifugation ist in **Abb. 9** zu sehen. Die Reaktionsmischungen wurden für 24 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde in Phosphatpuffer pH 7,0 (50 mM) durchgeführt. Die Gesamtkonzentration an PM betrug 1 mg/ml (0.5 mg/ml BR-WT + 0.5 mg/ml D96N/D85N), die Konzentration der BTGase wurde im Bereich zwischen

0,23 U/ml und 3,7 U/ml variiert. Von einem Zentrifugenröhrchen zum nächsten wurde die Konzentration an BTGase verdoppelt, d.h. die BTGase Konzentration steigt von Röhrchen B bis F. In A ist eine Reaktionsansatz zu sehen der ohne Zusatz von BTGase ebenfalls 24 h bei 37°C inkubiert wurde. Verglichen mit der Kontrollprobe ist bei den Reaktionsansätzen mit den geringsten BTGase Konzentrationen kein Unterschied festzustellen. Der leichte Versatz der Banden kann nicht als Indiz für eine Reaktion gewertet werden, da leichte Schwankungen im Zuckergradienten nicht ausgeschlossen werden können. Die Reaktionsansätze mit den höchsten BTGase Konzentrationen(D-E) unterscheiden sich jedoch drastisch von der Kontrollprobe. In D werden neben den ursprünglichen BR-Banden weitere Bande gefunden deren Farbe einer Mischfarbe von BR-WT und BR D96N/D85N entspricht. Mit dem letzten Reaktionsansatz, kann zweifelsfrei bewiesen werden, daß eine Reaktion zwischen unterschiedlichen Patches stattgefunden hat, da bei der Zentrifugation nur eine Bande, mit einer Mischfarbe aus BR-WT und BR-D96N/D85N gefunden wird. Zur Verdeutlichung der Ergebnisse sind in **Abb. 10** die Reaktionsansätze für die drei höchsten BTGase Konzentration vergrößert dargestellt.

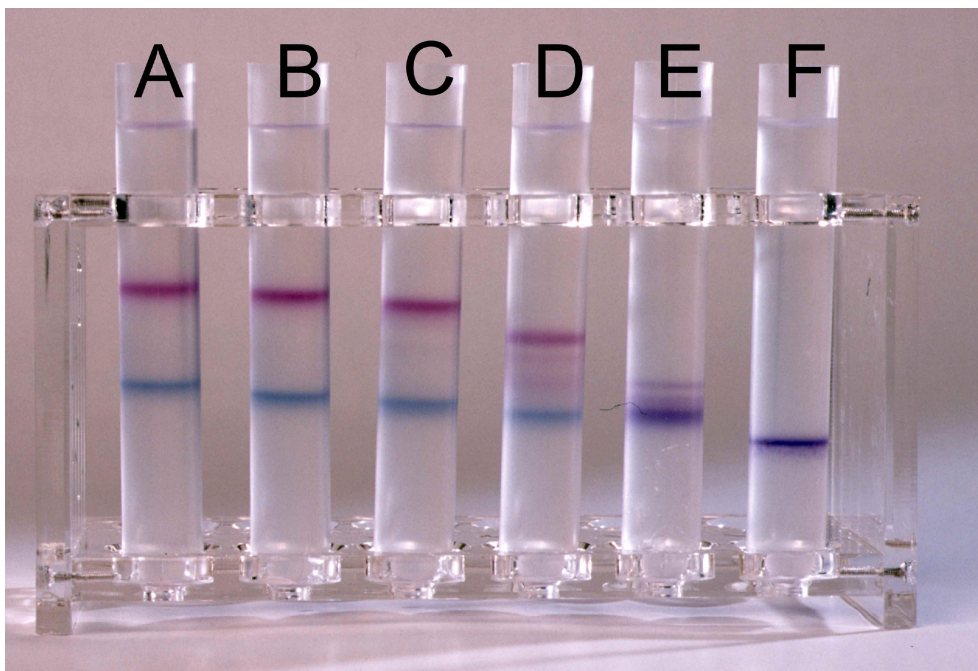


Abb. 9: Auftrennung der Reaktionsmischungen von PM und BTGase mit Dichtegradientenzentrifugation. Die Reaktionsmischungen mit einer Gesamtkonzentration an PM von 1 mg/ml (0,5 mg/ml BR-WT+0,5 mg/ml BR-D96N/D85N) wurde für 24 h bei 37°C inkubiert. Die BTGase Aktivität wurde zwischen A=0,23 U/ml und A=3,7 U/ml variiert. In A ist eine Kontrollprobe, die ohne Transglutaminase inkubiert wurde, gezeigt. Von Röhrchen zu Röhrchen wurde die BTGase Konzentration verdoppelt. Mit zunehmender BTGase Konzentration ist das Auftreten eines einzigen Reaktionsproduktes zu beobachten. Aus dieser Tatsache kann abgeleitet werden, daß eine intermembrane Reaktion stattgefunden hat.

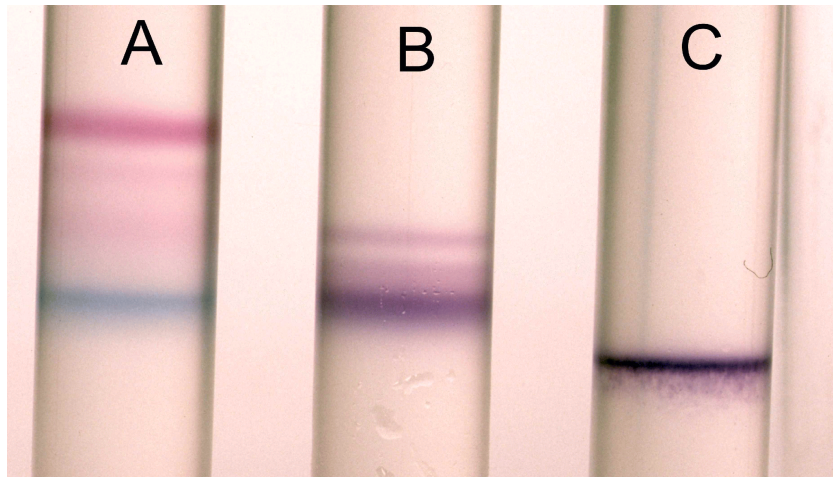


Abb. 10: Auftrennung der Reaktionsmischungen von PM und BTGase mit Dichtegradientenzentrifugation. Vergleichende Aufnahme der Reaktionsansätze zwischen PM und BTGase für die drei höchsten Konzentrationen an BTGase. Zur genauen Beschreibung s. Abb. 9.

4.3 Interpretation

Mit den vorgestellten Experimenten konnte nachgewiesen werden, daß Bakteriorhodopsin in membrangebundener Form ein BTGase-Substrat ist. Die BTGase verknüpft in einem zwei-stufigen katalytischen Prozeß die Aminosäuren Glutamin und Lysin. Da Bakteriorhodopsin in membrangebundener Form vorliegt, stehen nur die Aminosäuremoleküle in den sogenannten Loops zur Verfügung⁴. Auf der extrazellulären Seite der Membran befindet sich eine zugängliches Glutamin (Helix A, Position 3) in der Nähe des N-Terminus und ein Lysin (Helix D, Position 129). Auf der zytoplasmatischen Seite befinden sich hingegen eine Reihe von Lysinen, die für die Transglutaminase zugänglich sein sollten (Helix B, Position 40+41; Helix E, Position 159; Helix F, Position 172), jedoch kein Glutamin. D.h., es stehen genügend reaktive Stellen für eine Reaktion mit der Transglutaminase zur Verfügung. Ob die Verknüpfung zwischen den zytoplasmatischen Seiten der Membran, oder aber zwischen der extrazellulären und der zytoplasmatischen Seite stattfindet, kann mit den bisherigen Experimenten nicht abschließend geklärt werden. Dazu sind eine Reihe neuer Experimente nötig, die aus Zeitgründen nicht durchgeführt werden konnten

Ein Vergleich mit „guten“ Transglutaminasesubstraten, wie z.B. Casein oder Gelatine, zeigt jedoch, daß die Reaktionsgeschwindigkeit im Falle von Bakteriorhodopsin recht langsam ist. Diese Tatsache kann jedoch mit der möglicherweise schlechten Zugänglichkeit der Aminosäuren in der PM erklärt werden.

Auffällig ist auch, daß neben einer Dimeren Bande auch höhere Vernetzungsprodukte im SDS Gel gefunden werden. Diese Tatsache kann nur dann erklärt werden, wenn davon ausgegangen wird, daß ein PM-Patch über mehr als eine Bindung mit einem anderen Patch verbunden ist. Der genaue Reaktionsmechanismus dieser Reaktion konnte mit den gezeigten Experimenten jedoch nicht aufgeklärt werden.

⁴Darstellung der Aminosäuresequenz in [78]

4.4 Zusammenfassung

Mit den Experimenten konnte gezeigt werden, daß Bakteriorhodopsin ein Substrat für die bakterielle Transglutaminase aus *Streptovercillium mobaraense* ist. Im Vergleich mit herkömmlichen bifunktionellen Reagenzien zeichnet sich die BTGase dadurch aus, daß sie mit BR selektiv und unter schonenden Bedingungen reagiert. Eine Zerstörung des BR's während der Reaktion konnten nicht beobachtet werden. Das Stoppen der Reaktion ist problemlos durch ein kurzzeitiges erwärmen auf 80 °C möglich. Die BTGase wird dadurch inaktiviert.

Der genaue Reaktionsmechanismus und die exakten Bindungsstellen konnten noch nicht aufgeklärt werden. Hierzu würden sich BR-Mutanten anbieten, bei denen die relevanten Bindungsstellen durch Aminosäuren ausgetauscht sind, die keine Reaktion mit der BTGase eingehen können.

Mit dem Nachweis der Reaktion zwischen PM und BTGase wurden die Grundlagen für eine Vielzahl von Einsatzmöglichkeiten gelegt. Neben der direkten Verknüpfung von PM ist auch an die Anbindung von BR an Matrixmaterialien mit funktionellen Gruppen, die ein BTGase Substrat darstellen, denkbar. In diesem Fall wäre die Diffusion der PM patches eingeschränkt, bzw nahezu unmöglich, was bei optischen Anwendungen wie z.B. der Holographie von Vorteil wäre.

Daneben besteht die Möglichkeit, BR mit Hilfe der BTGase in Matrixmaterialien, die selbst ein Transglutaminasesubstrat darstellen, wie z.B. Gelatine einzupolymerisieren. Diese Versuche wurden auch schon erfolgreich durchgeführt. Der Vorteil des erhaltenen Materials ist, daß es im Gegensatz zu unvernetzter Gelatine wasserunlöslich ist. Diese Eigenschaft kann bei der Erzeugung von BR-Schichten von Vorteil sein.

Zusammenfassend ergibt sich, daß die Reaktion von BTGase mit Bakteriorhodopsin in membran-gebundener Form eine für technische Anwendungen höchst interessante Reaktion darstellt, deren Einsatzgebiete in der Zukunft noch erforscht und aufgezeigt werden müssen.

5 CHARAKTERISIERUNG VON BAKTERIORHODOPSIN-SCHICHTEN

5.1 Zielsetzung

Soll BR in einer Anwendung, wie z.B. der Holographischen Interferometrie oder der Sicherheitstechnik eingesetzt werden, dann ist die Lichtempfindlichkeit, die hauptsächlich von der M-Lebensdauer abhängt, ein zentraler Parameter. Die M-Lebensdauer in BR ist von vielen Faktoren abhängig. In Abhängigkeit vom untersuchten Material (BR-WT/BR-D96N) spielt der Wassergehalt der Probe und vor allen Dingen der pH-Wert eine entscheidende Rolle.

Ziel war es die kombinierten Einflüsse von pH-Wert und des Wassergehalt auf den Photozyklus und dabei besonders auf die M-Lebensdauer zu quantifizieren, um sie bei der Filmherstellung für die Holographische Interferometrie und für den Einsatz von Bakteriorhodopsin in der Sicherheitstechnik nutzbar zu machen. Deshalb wurden alle Untersuchungen an BR-Schichten durchgeführt, wobei Gelatine als Matrixmaterial verwendet wurde.

Zur Variation des pH-Wertes wurde die Aminosäure Arginin als Modellsubstanz verwendet (Einsatz von Aminosäuren zur pH-Wert-Einstellung in BR-Schichten/Filmen). Der Wassergehalt der Probe wurde durch die Umgebungsbedingungen eingestellt. Weiterhin wurde der Einfluß von Glycerin untersucht, das in Anwendungen eine positiven Einfluß auf die photophysikalischen Eigenschaften von BR zeigt, dessen Wirkungsweise aber noch nicht vollständig aufgeklärt ist [79].

Die M-Lebensdauer kann sowohl aus dem Abklingverhalten des M-Intermediates nach photochemischer Anregung bestimmt werden, ist aber auch durch Messungen im stationären Zustand zugänglich. Beide Verfahren kamen bei den durchgeführten Untersuchungen zur Anwendung.

5.2 Einfluß von Zusätzen auf B_{recovery} / M_{decay}

5.2.1 Versuchsdurchführung

Zur Untersuchung des Einflusses von verschiedenen Zusätzen auf den Photozyklus von BR wurden BR-Gelatine Schichten verwendet. Die endgültige Konzentration an Gelatine betrug 2,5 % (w/v). Die Proben wurden vor der Messung für mindestens 48 h bei rLF = 30 % getrocknet und unter gleichen Bedingungen vermessen. Die Konzentration der Zusätze ist im jeweiligen Experiment explizit angegeben. Sie beziehen sich auf die Konzentration der Substanz in der aufzutrocknenden Lösung. Die Konzentration an BR wurde so gewählt, daß die OD der Probe zwischen OD=1,0 und OD=1,5 lag. Die photochemische Anregung der Probe erfolgte für 5 s mit einem Nd:YAG Laser (DPSS200, Coherent) und einer Intensität von 100 mW/cm². Nach Abschalten des aktinischen Lichtes wurden mindestens 24 Spektren in äquidistanten Zeitabständen aufgenommen. Bei Bedarf wurde die Messung mit einem größeren Zeitintervall wiederholt. Aus dem zeitlichen Verlauf der Spektren konnten Kurven für B_{recovery} und M_{decay} abgeleitet werden.

Im Idealfall wurde eine monoexponentielle Zerfallskurve erhalten. Deren Steigung lieferte τ_M , für B_{recovery} und M_{decay} . Traten Abweichungen von der erwarteten monoexponentiellen Kinetik auf, so wurde versucht die Kurve mit zwei Exponentialfunktionen zu beschreiben. In diesem Fall werden dann die reziproken Steigungen der Funktionen angegeben (t_1 und t_2) sowie deren Anteile (A_1 und A_2) wobei immer gilt: $A_1 + A_2 = 1$.

Kann die erhaltene Kurve mit einer biexponentiellen Kurve nicht mehr angepaßt werden, so wird von einer Kinetik 2. Ordnung gesprochen. Grund dafür ist, daß die reziproke Auftragung von B_{recovery} und M_{decay} gegen die Zeit eine Gerade liefert, was den theoretischen Voraussagen für eine Reaktion 2. Ordnung entspricht.

In diesem Fall stellen die Werte t_1 und t_2 den Abfall der OD auf 50 % (τ_{50}) und 10 % (τ_{10}) der erzielten ΔOD nach Abschalten des aktinischen Lichtes dar. Um die Ergebnisse von Proben mit unterschiedlicher Kinetik besser vergleichen zu können, wurde bei Bedarf die effektive Lebensdauer der Reaktion nach [80] berechnet.

5.2.2 Einfluß auf BR-WT

5.2.2.1 Arginin

In **Tabelle 9** ist der konzentrationsabhängige Einfluß von Arginin auf die B_{recovery} von BR-WT zusammengefaßt. Die erste Spalte gibt die Variation der Arginin-Konzentration wieder. Sie wurde im Bereich zwischen 100 mM und 1,56 mM logarithmisch variiert. Die letzte Probe ist eine Kontrollprobe ohne Arginin. Für alle Arginin-Konzentrationen entspricht der Abfall einer Reaktion 2.Ordnung. Eine Auswertung des M_{decay} führt aufgrund des schlechten Signal/Rauschverhältnisses bei 410 nm zu keinen sinnvollen Ergebnissen.

Mit steigender Arginin-Konzentration nimmt die Lebensdauer des M-Intermediates stetig zu. Mißt man den pH-Wert der reinen Gelatinelösung (Photogelatine, Stöss AG, Eberbach) in Wasser, dann erhält man $\text{pH} \approx 4.5-5$. Dieser saure pH-Wert ist auf die Herstellungsbedingungen zurückzuführen (saurer Aufschluss). Durch den Zusatz von Arginin ($\text{pK}_a(\alpha\text{-NH}_3) = 8.99$; $\text{pK}_a(\text{Guanidino-Gruppe}) = 12.48$) wird der pH-Wert der Gelatinelösung erhöht. Ein Zusatz von 50 mM Arginin zu einer 1% Gelatinelösung hat zur Folge, daß der pH-Wert der Lösung $\text{pH} = 10.2$ beträgt. Die Erhöhung der Lebensdauer des M-Intermediates kann demzufolge mit der pH-Wert Änderung erklärt werden.

Tabelle 9: Konzentrationsabhängiger Einfluß von Arginin auf B_{recovery} von BR-WT

c [mM]	Kinetik	B_{recovery}	
		τ_{50} / s	τ_{10} / s
100,00	2. Ord.	27,70	363,00
50,00	2. Ord.	22,00	322,50
25,00	2. Ord.	13,50	394,20
12,50	2. Ord.	20,81	420,00
6,25	2. Ord.	15,04	331,00
3,13	2. Ord.	19,70	421,00
1,56	2. Ord.	2,04	21,30
0,00	2. Ord.	1,98	32,80

5.2.2.2 Glyzerin

In **Tabelle 10** ist der konzentrationsabhängige Einfluß von Glyzerin auf B_{recovery} , bzw. M_{decay} zusammengefaßt. In der ersten Spalte ist die Konzentration an Glyzerin angegeben. Die Konzentration in der aufgetragenen Suspension wurde zwischen 10 % (V/V) und 0,16 % (V/V) variiert. Die letzte Probe ist eine Kontrollprobe, der kein Glyzerin zugesetzt wurde. In der zweiten Spalte wird die Kinetik des Kurvenverlaufes beschrieben. Bei hohen Glyzerinkonzentrationen bis 1,25 % (V/V) wurde monoexponentielles Verhalten gefunden. Die M-Lebensdauer ist bei diesen Proben konstant und beträgt ungefähr 0,2 s. Für M_{decay} und B_{recovery} werden die gleichen Zeiten gefunden, so daß davon ausgegangen werden kann, daß nur die Intermediate B und M beteiligt sind. Wird die Glyzerin-Konzentration weiter gesenkt, ändert sich die Kurvenform. Die Kinetik kann dann nur noch mit einer bi-exponentiellen Funktion beschrieben werden. Während sich die Steigungen der Exponentialfunktionen praktisch nicht ändert, ändert sich deren Anteil. So sinkt der Anteil der kurzen Komponente von 0,63 auf 0,29, während der Anteil der langen Komponente von 0,36 auf 0,71 steigt.

Tabelle 10: Konzentrationsabhängiger Einfluß von Glyzerin auf M_{decay} und B_{recovery} von BR-WT

		B_{recovery}				M_{decay}			
c [% (V/V)]	Kinetik	t_1 / s				t_1 / s			
10,00	1. Ord.	0,27				0,26			
5,00	1. Ord	0,20				0,19			
2,50	1. Ord.	0,22				0,22			
1,25	1. Ord.	0,22				0,24			
c [% (V/V)]	Kinetik	t_1 / s	t_2 / s	A_1	A_2	t_1/s	t_2/s	A_1	A_2
0,63	bi exp	0,38	3,63	0,63	0,36	0,29	2,25	0,44	0,56
0,31	bi exp.	0,32	4,30	0,54	0,45	0,30	3,90	0,40	0,60
0,16	bi exp.	0,42	4,80	0,39	0,61	0,43	4,85	0,32	0,68
0,00	bi exp.	0,40	4,30	0,29	0,71	0,30	4,31	0,24	0,76

In **Abb. 11** ist die effektive Lebensdauer des Übergangs gegen die Glycerin-Konzentration aufgetragen. Die effektive Lebensdauer hat für hohe und niedrige Glycerin-Konzentrationen einen Maximal bzw. Minimalwert. Dazwischen existiert ein linearer Übergangsbereich. Der Kurvenverlauf (eye-guiding-line) kann als sigmoidal beschrieben werden. Mit steigender Glycerin-Konzentration nimmt die effektive Lebensdauer τ_{eff} ab.

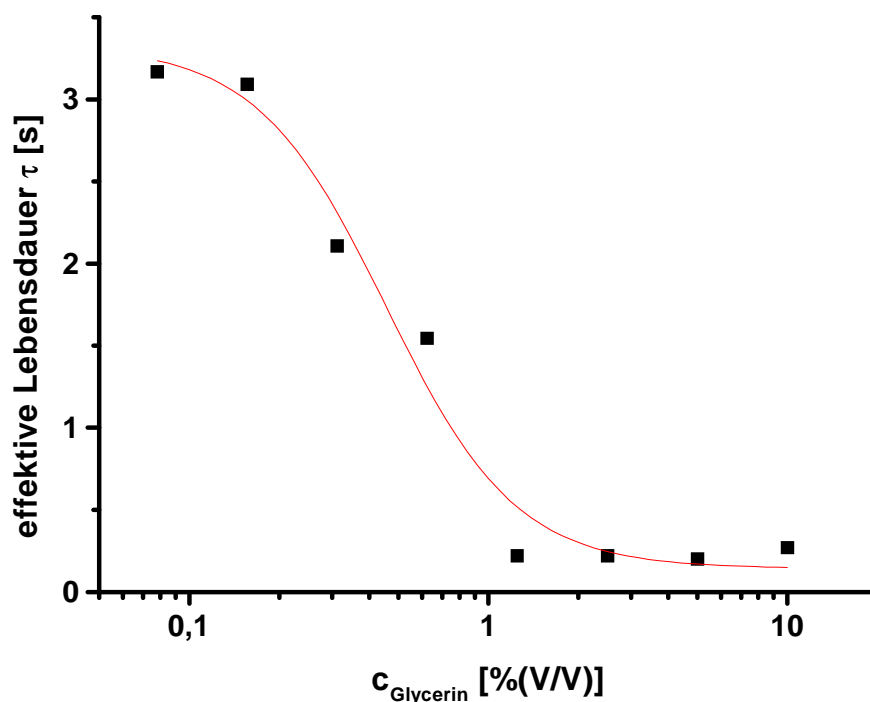


Abb. 11: Effektive Lebensdauer τ in Abhängigkeit von der Glycerin-Konzentration für BR-WT. Mit steigender Glycerin-Konzentration nimmt die effektive Lebensdauer für BR-WT ab. Der thermische Zerfall von M nach B scheint durch die Zugabe von Glycerin beschleunigt zu werden.

5.2.2.3 Arginin und Glycerin

In **Tabelle 11** ist der kombinierte Einfluß von Arginin und Glycerin auf B_{recovery} bzw. M_{decay} von BR-WT zusammengefaßt. Die Konzentration von Glycerin wurde konstant gehalten (10 % (V/V)), während die Arginin-Konzentration im Bereich zwischen 100 mM und 6 mM variiert wurde (s. erste Spalte). Auch hier ändert sich die Kinetik der Reaktion. Bei hohen Arginin-Konzentrationen entspricht der Kurvenverlauf einer biexponentiellen Funktion, während er bei kleinen Arginin-Konzentrationen als monoexponentiell beschrieben werden kann. Auffällig ist dabei, daß der Anteil der kurzen Komponente im biexponentiellen Zerfall sehr klein ist. Auch

hier kann im Rahmen der Meßgenauigkeiten von einer guten Übereinstimmung zwischen M_{decay} und B_{recovery} gesprochen werden.

Tabelle 11: Konzentrationsabhängiger Einfluß von Arginin bei konstanter Glycerin-Konzentration (10 % (V/V)) auf M_{decay} bzw. B_{recovery} von BR-WT.

		B_{recovery}				M_{decay}			
c [mM]	Kinetik	t_1 / s	t_2 / s	A_1	A_2	t_1 / s	t_2 / s	A_1	A_2
100,00	bi exp.	0,42	11,30	0,14	0,86	0,38	15,00	0,17	0,83
50,00	bi exp.	0,25	4,97	0,10	0,90	0,28	6,32	0,11	0,89
25,00	bi exp.	0,21	3,49	0,07	0,93	0,48	4,90	0,15	0,85
c [mM]	Kinetik	τ_M				τ_M			
12,50	1. Ord.	2,23				1,69			
6,25	1. Ord.	2,46				3,15			
0,00	1. Ord.	0,58				0,76			

5.2.3 Einfluß auf BR-D96N

5.2.3.1 Arginin

In **Tabelle 12** ist der konzentrationsabhängige Einfluß von Arginin auf den M-Zerfall der Mutante D96N zusammengefaßt. Die Konzentration an Arginin wurde im Bereich zwischen 100 mM und 1,5 mM variiert. Die letzte Probe ist eine Kontrollprobe, die kein Arginin enthält. Die Kinetik des Zerfalls konnte weder mit einer einfachen Exponentialfunktion, noch mit einer bi-exponentiellen Funktion angepaßt werden. Unabhängig von der Arginin-Konzentration entspricht die Kinetik einer Reaktion 2. Ordnung. Die Steigungen der Exponentialfunktion wurden durch die Zeiten ersetzt, die benötigt werden, um auf 50 % bzw. 10 % der nach Abschalten des aktinischen Lichtes erzielten ΔOD zu gelangen. Mit steigender Arginin-Konzentration steigen diese Werte an. Dieser Anstieg ist besonders für kleine Arginin-Konzentrationen stark ausgeprägt. Für hohe Arginin-Konzentrationen wird ein Maximalwert erreicht, der nicht mehr gesteigert werden kann. Um diesen Sachverhalt zu verdeutlichen, sind in **Abb. 12** die Zeiten τ_{50} und τ_{10} gegen die Arginin-Konzentration der Probe aufgetragen.

Tabelle 12: Konzentrationsabhängiger Einfluß von Arginin auf B_{recovery} von BR-D96N

c (Arginin) [mM]	Kinetik	B_{recovery}	
		τ_{50} / s	τ_{10} / s
100,00	2. Ordnung	19,90	360,00
50,00	2. Ordnung	18,90	359,80
25,00	2. Ordnung	18,60	420,00
12,50	2. Ordnung	19,80	323,00
6,25	2. Ordnung	24,30	379,00
3,13	2. Ordnung	11,30	188,00
1,56	2. Ordnung	2,03	21,00
0,78	2. Ordnung	1,59	18,00

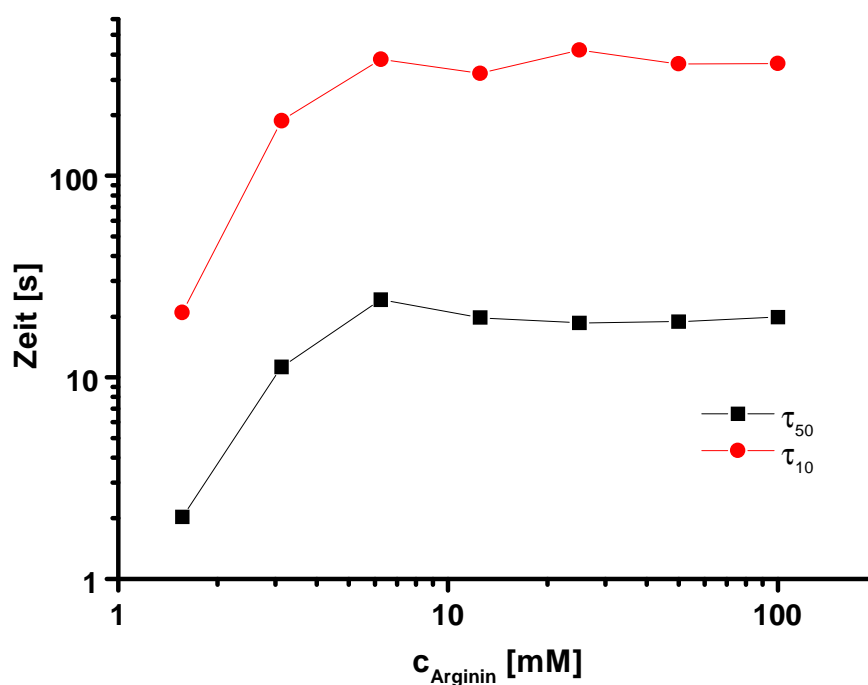


Abb. 12 Zeiten τ_{50} und τ_{10} in Abhängigkeit von der Arginin-Konzentration für BR-D96N. Mit steigender Arginin-Konzentration nehmen beide Zeiten zu. Die Kurvenform ist für beide Zeiten identisch. Für geringe Arginin-Konzentrationen ist ein starker Anstieg zu verzeichnen, der zu hohen Konzentrationen hin abflacht. Für hohe Konzentrationen an Arginin streben beide Zeiten einem Maximalwert zu.

5.2.3.2 Glycerin

In **Tabelle 13** ist der konzentrationsabhängige Einfluß von Glycerin auf M_{decay} bzw. B_{recovery} für BR-D96N zusammengefaßt. Die Konzentration an Glycerin wurde zwischen 10 % (V/V) und 0,16 % (V/V) variiert. Die letzte Probe ist eine Kontrollprobe, der kein Glycerin zugesetzt wurde. Der Kurvenverlauf kann für die ersten fünf Proben mit einer Exponentialfunktion beschrieben werden. Für geringe Konzentrationen an Glycerin müssen zwei Exponentialfunktion verwendet werden, um den Kurvenverlauf zu beschreiben. Es wird eine gute Übereinstimmung zwischen M_{decay} und B_{recovery} gefunden. Die Lebensdauern des M-Zustandes nehmen mit sinkender Glycerin-Konzentration zu. In **Abb. 13** ist die Lebensdauer in Abhängigkeit von der Glycerin-Konzentration dargestellt. Für die letzten drei Konzentrationen wurde zur Vergleichbarkeit die effektive Lebensdauer berechnet. Insgesamt kann von einem sigmoidalen Kurvenverlauf gesprochen werden. Es existiert für hohe und für niedrige Glycerin-Konzentrationen ein Maximal, bzw. ein Minimalwert. Sie sind über einen nahezu linearen Übergangsbereich verbunden.

Tabelle 13: Konzentrationsabhängiger Einfluß von Glycerin auf M_{decay} bzw. B_{recovery} von BR-D96N

		B_{recovery}				M_{decay}			
c	Kinetik	τ_M / s				τ_M / s			
[% (V/V)]									
10.00	1. Ord.	1.13				1.20			
5.00	1. Ord.	1.17				1.11			
2.50	1. Ord.	1.04				1.09			
1.25	1. Ord.	1.42				1.43			
0.63	1. Ord.	1.39				2.53			
c	Kinetik	t_1 / s	t_2 / s	A_1	A_2	t_1 / s	t_2 / s	A_1	A_2
[% (V/V)]									
0,31	bi exp.	0,16	2,50	0,27	0,73	0,76	3,54	0,33	0,67
0,16	bi exp	0,20	2,90	0,22	0,78	2,05	2,58	0,35	0,64
0,00	bi exp.	0,17	2,83	0,23	0,73				

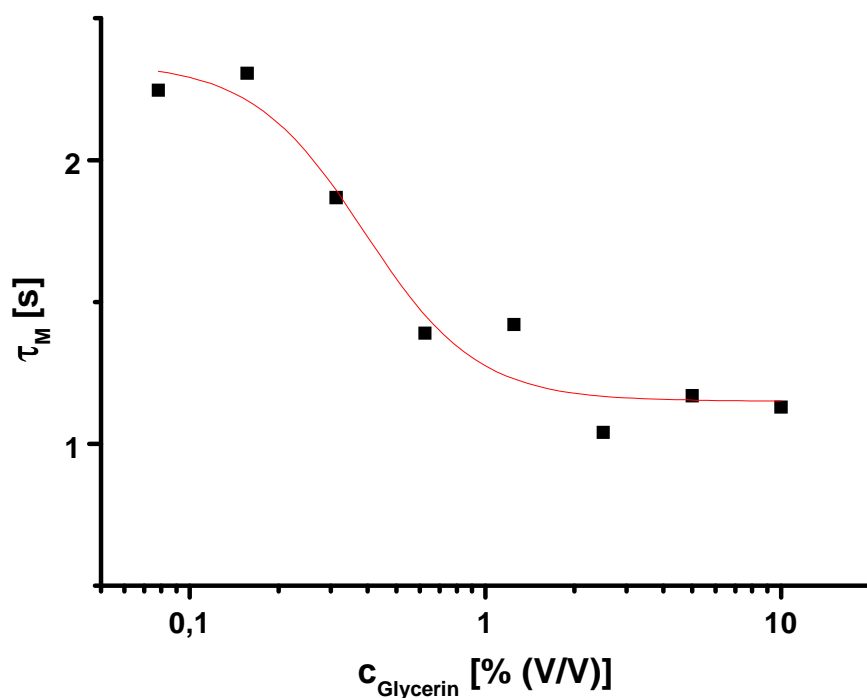


Abb. 13 Lebensdauer des M-Zustandes für BR-D96N. τ_M ist in Abhängigkeit der Glycerin-Konzentration aufgetragen. Der Kurvenverlauf kann als sigmoidal bezeichnet werden (eye-guiding line). Mit sinkender Glycerin-Konzentration ist eine Abnahme der Lebensdauer zu beobachten.

5.2.3.3 Arginin und Glycerin

In **Tabelle 14** ist der konzentrationsabhängige Einfluß von Arginin bei einer konstanten Glycerin-Konzentration auf M_{decay} bzw. B_{recovery} von BR-D96N zusammengefaßt. Die Arginin-Konzentration wurde im Bereich zwischen 100 mM und 3,1 mM variiert. Die letzte Probe ist eine Kontrollprobe, der kein Arginin zugesetzt wurde. Ein Vergleich von M_{decay} und B_{recovery} zeigt gute Übereinstimmung über den gesamten Konzentrationsbereich von Arginin. Der zeitliche Verlauf von M_{decay} , bzw. B_{recovery} kann ebenfalls über den gesamten Konzentrationsbereich von Arginin mit einer einfachen Exponentialfunktion beschrieben werden. Der Anstieg von M_{decay} mit steigender Arginin-Konzentration ist in **Abb. 14** dargestellt. Für hohe Konzentrationen ist die Lebensdauer des M-Intermediates nahezu konstant, wohingegen sie zu kleinen Konzentration hin stark abfällt.

Tabelle 14: Konzentrationsabhängiger Einfluß von Arginin bei konstanter Glycerin-Konzentration (10 % (V/V)) auf M_{decay} bzw. $B_{recovery}$ von BR-D96N

c [mM]	Kinetik	$B_{recovery}$	M_{decay}
		τ_{50} [s]	τ_{50} [s]
100,00	1. Ordnung	133,00	146,20
50,00	1. Ordnung	129,20	123,45
25,00	1. Ordnung	112,40	115,90
12,50	1. Ordnung	99,10	87,54
6,25	1. Ordnung	38,50	30,50
3,13	1. Ordnung	2,97	3,19
0,00	1. Ordnung	0,95	1,05

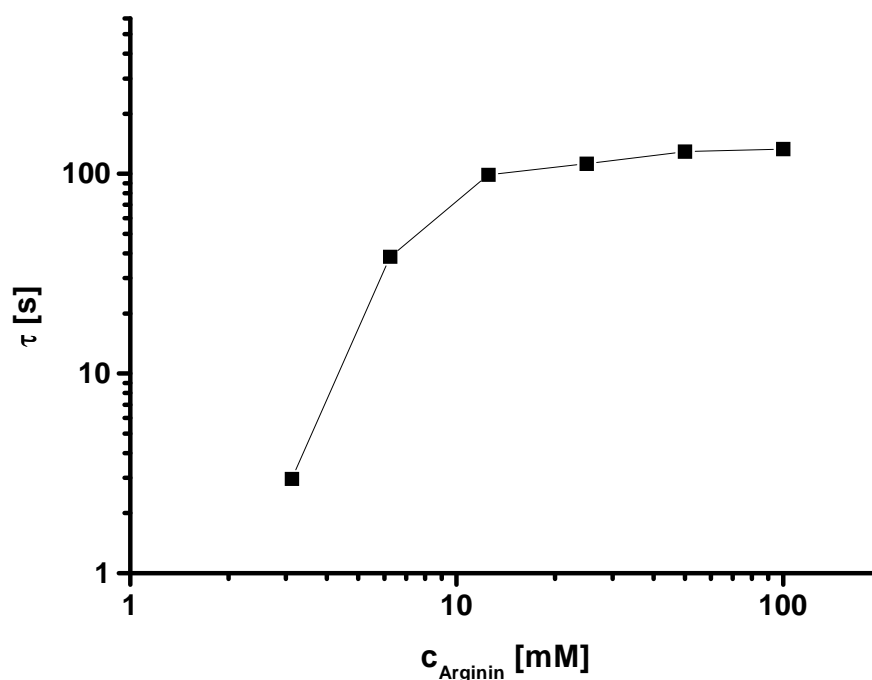


Abb. 14 M_{decay} für BR-D96N. Zeitkonstante des M_{decay} aufgetragen gegen die Konzentration an Arginin bei einer konstanten Glycerin-Konzentration. Für hohe Konzentrationen wird für die Zeitkonstante ein Maximalwert erreicht. Für kleine Konzentrationen nimmt die Zeitkonstante ab.

5.2.4 Einfluß des Trocknungsgrades

In **Tabelle 15** sind die Zeiten für M_{decay} bzw. B_{recovery} dreier unterschiedlicher Proben von BR-WT zusammengefaßt. Die erste Probe enthielt 100 mM Arginin, die zweite Probe 100 mM Arginin und 10 % (V/V) Glycerin und die dritte Probe enthielt nur Glycerin mit einer Konzentration von 10 % (V/V). Im Gegensatz zu den vorherigen Untersuchungen wurde diese Probe nur etwa für 12 h bei $rLF = 30\%$ im Trockenschrank getrocknet.

Die Kinetik der Reaktion konnte in allen drei Fällen mit einer einfachen Exponentialfunktion beschrieben werden. Es wurde eine gute Übereinstimmung zwischen M_{decay} und B_{recovery} gefunden. Die Zeit für die Probe, die nur Arginin enthielt, war etwa doppelt so groß wie für die Probe, die Arginin und Glycerin enthält. Die kürzeste Zeit wurde bei der Probe gefunden, die nur Glycerin enthält.

Tabelle 15: M_{decay} bzw. B_{recovery} von BR-WT nach 12 h im Trockenschrank bei $rLF = 30\%$

		B_{recovery}	M_{decay}
Probe	Kinetik	τ_M [s]	τ_M [s]
Arginin	1. Ord.	145,90	150,40
Arginin + Glycerin	1. Ord.	71,10	71,40
Glycerin	1. Ord.	1,88	2,13

In **Tabelle 16** sind die Zeiten für M_{decay} bzw. B_{recovery} für drei unterschiedliche Proben mit BR-D96N zusammengefaßt. Die erste Probe enthielt 100 mM Arginin, die zweite Probe 100 mM Arginin und 10 % (V/V) Glycerin und die dritte Probe enthielt nur Glycerin mit einer Konzentration von 10 % (V/V). Die Proben wurden nur etwa für 12 h bei $rLF = 30\%$ im Trockenschrank getrocknet. Die Kinetik der Reaktion konnte in allen drei Fällen mit einer einfachen Exponentialfunktion beschrieben werden. Es wurde eine gute Übereinstimmung zwischen M_{decay} und B_{recovery} gefunden. Die Zeit der Probe, die nur Arginin enthielt, war größer als die Zeit der Probe, die Arginin und Glycerin enthält. Der Unterschied in den Zeiten fiel aber wesentlich geringer für BR-D96N als für BR-WT aus. Bei BR-WT wurde eine Verdopplung der Zeit erzielt, wohingegen für BR-D96N nur eine Erhöhung der Zeit um den Faktor 1,23 erreicht wurde. Die kürzeste M_{decay} -Zeit wurde auch hier für die Probe gefunden, die nur Glycerin enthält.

Tabelle 16: M_{decay} bzw. $B_{recovery}$ von BR-D96N nach 12 h im Trockenschrank bei $rLF = 30\%$

		$B_{recovery}$	M_{decay}
Probe	Kinetik	τ_M / s	τ_M / s
Arginin	1. Ord.	260,40	258,00
Arginin + Glycerin	1. Ord.	211,80	185,80
Glycerin	1. Ord.	1,10	--

5.2.5 Zusammenfassung und Interpretation

Mit den zuvor beschriebenen Experimenten sollte der Einfluß von verschiedenen Substanzen auf den Phototzyklus von Bakteriorhodopsin geklärt werden. Dabei stand vor allen Dingen im Vordergrund, inwieweit diese Substanzen bei der Herstellung von BR-Schichten (Drucken von BR) und von BR-Filmen von Nutzen sein könnten. Die Ergebnisse der Experimente lassen sich wie folgt zusammenfassen.

Arginin

Sowohl für BR-WT, als auch für die Mutante D96N führt der Zusatz von Arginin zu einer erheblichen Verlangsamung der thermischen Reaktion von M nach B. Dieser Effekt ist stark konzentrationsabhängig.

Titriert man eine Gelatinelösung mit Arginin, erhält man eine Titrationskurven mit einem Minimum bei $pH \approx 4.7$, einem Maximum bei hohen pH-Werten ($pH \geq 10$). Dazwischen existiert ein linearer Übergangsbereich. Vergleicht man die erhaltene Titrationskurve mit der Abhängigkeit der M-Lebensdauer von der Arginin-Konzentration, findet man eine gute Übereinstimmung zwischen den Kurven. Sowohl die Plateauphase (Minimum) für kleine Arginin-Konzentrationen, der lineare Übergangsbereich und die Plateauphase für hohe Arginin-Konzentrationen lassen sich in beiden Kurven finden. Demnach ist der Effekt des Arginins, im Gegensatz zu [81], mit einer Einstellung des pH-Wertes zu erklären. Diese Annahme wird durch Experimente mit einer anderen Aminosäure unterstützt (Glutamin, $pK_a = 9.13$) mit der vergleichbare M-Lebensdauern wie mit Arginin gemessen werden konnten. Günstig wirken sich bei einem Einsatz von Arginin die beiden pK_a -Werte der Aminosäure aus, sie führen zu einer Pufferwirkung im hohen pH-Bereich.

Glyzerin

Der Einfluß von Glyzerin auf den Photozyklus von BR und dabei hauptsächlich auf die thermische Reaktion von M nach B scheint etwas komplexer zu sein. Ein Vergleich von BR-WT und BR-D96N zeigt, daß der Zusatz von Glyzerin qualitativ zu den gleichen Ergebnissen führt, daß es aber quantitative Unterschiede im Verhalten von BR-WT und BR-D96N gibt.

Der Zusatz von Glyzerin führt zu einer Veränderung im kinetischen Verhalten. Unabhängig vom verwendeten Material (BR-WT, BR-D96N) ist die Kinetik bei hohen Glyzerin-Konzentrationen, wie nach dem simplen Zwei-Zustandsmodell erwartet, monoexponentiell. Zu geringen Glyzerin-Konzentrationen ändert sich das kinetische Verhalten. Es kann dann nur noch mit zwei exponentiellen Funktionen beschrieben werden.

Die effektive Lebensdauer der Reaktion sinkt mit zunehmender Glyzerin-Konzentration sowohl für BR-WT als auch für die Mutante D96N. In beiden Fällen (**Abb. 11** und **Abb. 13**) kann von einem sigmoidalen Kurvenverlauf gesprochen werden. Während die Änderung der effektiven Lebensdauer für BR-D96N nur sehr gering ausfällt (Faktor ca. 2,0) sinkt die effektive Lebensdauer für BR-WT mit steigender Glyzerin-Konzentration um den Faktor 10. Während die absoluten Werte der effektiven Lebensdauer für BR-WT und BR-D96N für geringe Konzentrationen an Glyzerin in etwa gleich groß sind, findet man bei geringen Glyzerin-Konzentrationen für BR-D96N eine um den Faktor 10 größere effektive Lebensdauer als für BR-WT. Dieser Faktor stimmt mit den Werten, die für den Unterschied von BR-WT und BR-D96N in Suspensionen [46] beschrieben werden, gut überein.

Arginin und Glyzerin

Die Effekte von Arginin und Glyzerin können durchaus als additiv verstanden werden. So ist im Falle der Proben, die Arginin in wechselnden Konzentrationen und Glyzerin in konstanter Konzentration enthielten, zu beobachten, daß die Kinetik für BR-D96N immer mit einer einfachen Exponentialfunktion beschrieben werden kann. Diese Tatsache gilt auch für BR-WT bei geringen Arginin-Konzentrationen. Bei höheren Konzentrationen werden Abweichungen vom monoexponentiellen Verhalten gefunden. Da der Anteil der zweiten Komponente allerdings sehr klein ist, können diese Abweichungen praktisch vernachlässigt werden.

Unabhängig von der beobachteten Kinetik zeigt Arginin den Puffereffekt, den es auch in den Proben ohne Glyzerin hat. Für BR-D96N ist dieser Effekt wesentlich größer als im Falle von BR-WT. Damit wird das für Suspensionen gefundene Verhalten exakt wiedergegeben [82]. Durch

den Austausch der Aminosäure in Position 96 des Proteins wird der Photozyklus stärker an den pH-Wert des umgebenden Mediums gekoppelt, da die Reprotonierung von der extrazellulären Seite her geschieht (der interne Protonendonor Asparaginsäure wurde durch Asparagin ersetzt).

Einfluß des Trocknungsgrades

Der Trocknungsgrad der Probe hat einen erheblichen Einfluß auf das kinetische Verhalten der Probe. Wird die Kinetik einer Probe betrachtet, die noch nicht vollständig auf rLF = 30 % getrocknet wurde, so stellt man fest, daß sich die Kinetik dieser Probe deutlich von der der gleichen Probe im vollständig getrockneten Fall unterscheidet. Diese wird besonders an den Proben, die 100 mM Arginin enthalten (BR-WT und BR-D96N), deutlich. Beide zeigen im Gegensatz zu den vollständig getrockneten Proben eine Kinetik, die mit einer einfachen Exponentialfunktion beschrieben werden kann. D.h. der Trocknungsgrad und damit der Wassergehalt der Probe entscheidet über die Kinetik. Für eine Probe mit einem geringen Wassergehalt wird eine Kinetik gefunden, die deutlich von der nach dem simplen Zwei-Zustandsmodell erwarteten monoexponentiellen Kurve abweicht. Dabei fällt auf, daß diese Abweichungen sowohl für B_{recovery} , als auch für M_{decay} zu finden sind. Für Proben mit hohem Wassergehalt wird dagegen eine Kinetik gefunden die dem Zwei-Zustandsmodell von Bakteriorhodopsin entspricht.

Eine Verringerung des Wassergehaltes der Probe hat weiterhin zur Folge, daß der M_{decay} , bzw. die B_{recovery} verlangsamt wird.

Neben dem Wassergehalt der Probe beeinflußt auch ein Zusatz von Glycerin die Kinetik des M-Zerfalls. Proben mit hoher Glycerin-Konzentration zeigen in allen Fällen (auch in Kombination mit Arginin) eine Kinetik, die mit einer Exponentialfunktion beschrieben werden kann, und die damit mit dem einfachen Zwei-Zustandsmodell übereinstimmt.

Für BR-WT ist bekannt, daß die M-Lebensdauer im Gegensatz zu der Mutante D96N abhängig vom Wassergehalt der Probe ist [83]. Bei den durchgeführten Experimenten wurde für BR-D96N ein leichter Anstieg der effektiven Lebensdauer mit abnehmender Glycerin-Konzentration gefunden, der Anstieg fällt aber wesentlich geringer aus als im Fall von BR-WT. Bei den nur zum Teil getrockneten Proben zeigt die M-Lebensdauer von BR-D96N kaum einen Unterschied zwischen der Probe mit Arginin ($\tau_M=260$ s) und der Probe mit Arginin und Glycerin ($\tau_M=211$ s). Dahingegen ist für BR-WT eine Änderung von $\tau_M=140$ s (Arginin) nach $\tau_M=70$ s (Arginin und Glycerin) zu beobachten.

Für den Einfluß von Glycerin ergeben sich damit zwei Möglichkeiten: (a) als hygroskopische Substanz erhöht es den Wassergehalt der Probe, d.h. eine hohe Glycerin-Konzentration entspricht einem hohen Wassergehalt in der Probe, (b) es kann das fehlende Wasser, das zu einer Veränderung in der Kinetik des M-Zerfalls führt, ersetzen. Die genaue Wirkungsweise kann mit diesen Experimenten nicht abschließend geklärt werden.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Pufferwirkung von Arginin geeignet ist, die Lebensdauer von BR-WT und BR-D96N in Gelatineschichten reproduzierbar einzustellen. Für Glycerin konnte gezeigt werden, daß durch einen Zusatz von Glycerin die Kinetik der Reaktion beeinflusst wird. Durch einen Zusatz erhält man eine Kinetik, die mit dem einfachen Zwei-Zustandsmodell zu erklären ist.

5.3 Einfluß des Wassergehalts auf M-Decay/B-Recovery

5.3.1 Einführung

Nachdem im vorangegangenen Kapitel gezeigt werden konnte, daß der Wassergehalt einen erheblichen Einfluß auf den M_{decay} bzw. auf die B_{recovery} hat, sollte dieser Einfluß genauer quantifiziert werden. Neben einer kontinuierlichen Veränderung des Wassergehalts der Probe sollte auch untersucht werden, ob eine pH-Wert Abhängigkeit festzustellen ist.

5.3.2 Einfluß des pH-Wertes

5.3.2.1 Versuchsdurchführung

Vor der Messung wurden die Proben für 24 h in einer Atmosphäre definierter Luftfeuchtigkeit äquilibriert. Die relative Luftfeuchte (rLF) konnte zwischen 90 % und 20 % variiert werden. Der pH-Wert der Probe wurde mit Arginin und konz. HCl eingestellt. Er wurde zwischen pH = 5 und pH = 10,5 variiert. Die Versuchsdurchführung entsprach der in Kap. 5.2.1 beschriebenen.

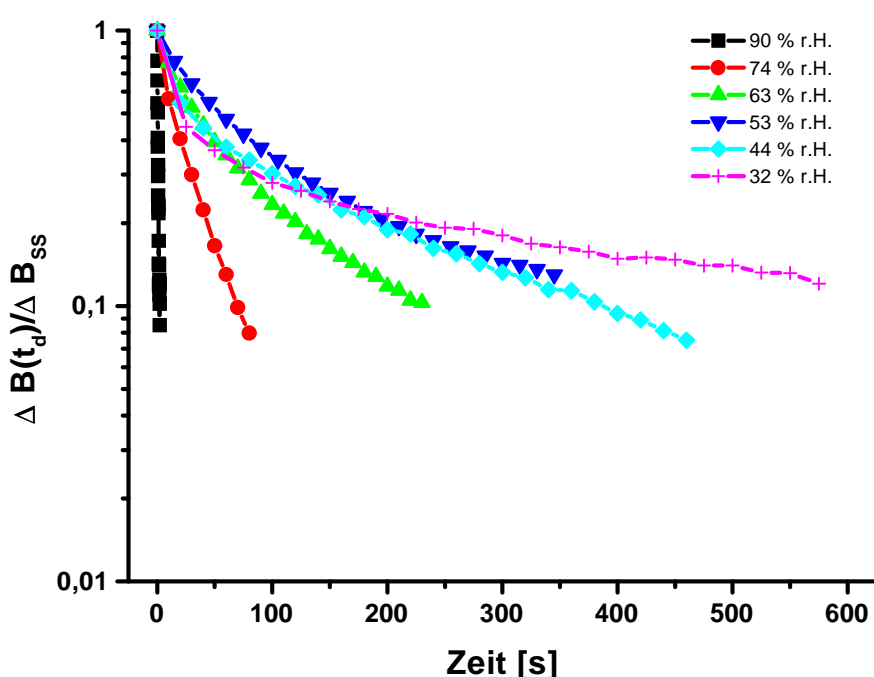


Abb. 15: B_{recovery} für BR-WT nach photochemischer Anregung. Nach photochemischer Anregung ($\lambda=532 \text{ nm}$, 100 mW/cm^2) ist die Änderung der OD bei 570 nm in Abhängigkeit von der Zeit für BR-WT bei pH = 10.5 und sechs verschiedenen relativen Luftfeuchtigkeiten dargestellt. Mit Reduzierung des Wassergehalts werden Abweichungen von dem erwarteten monoexponentiellen Verhalten sichtbar (nach der Theorie wird durch die semilogarithmische Auftragung eine Gerade erwartet). Aus diesem Grund kann aus diesen Kurven τ_M nicht mehr bestimmt werden. Zur Vergleichbarkeit der Proben untereinander wird deshalb τ_{50} verwendet.

In **Abb. 15** ist die Änderung der OD nach photochemischer cw-Anregung (5 s, 100 mW/cm²) bei 570 nm in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Es sind die Kurven einer BR-WT-Probe bei sechs verschiedenen Luftfeuchtigkeiten (gekennzeichnet durch unterschiedliche Symbole) dargestellt. Der pH-Wert der aufgetragenen Suspension betrug 10,5. Bei geringen relativen Luftfeuchtigkeiten kommt es zu drastischen Abweichungen vom theoretisch erwarteten monoexponentiellen Verhalten, denn auf Grund der logarithmischen Darstellung der y-Achse sollten sich theoretisch Geraden ergeben.

Das Abweichen vom monoexponentiellen Verhalten führte dazu, daß die Angabe der Lebensdauer τ_M nicht mehr möglich war. Zur Vergleichbarkeit der Proben untereinander wurde deshalb τ_{50} verwendet. Da zwischen B_{recovery} und M_{decay} kein Unterschied festgestellt werden konnte, werden im folgenden nur die Ergebnisse für B_{recovery} gezeigt und diskutiert.

5.3.2.2 *Ergebnisse für BR-WT*

In **Abb. 16** und in **Abb. 17** sind die Ergebnisse der kinetischen Messung für BR-WT bei acht verschiedenen pH-Werten (pH = 5 bis pH = 10,5) und 7 verschiedenen relativen Luftfeuchtigkeiten⁵ (rLF = 95 % bis rLF = 20 %) dargestellt. In **Abb. 16** ist die B-Recovery in Abhängigkeit vom pH-Wert für vier verschiedene relative Feuchten aufgetragen. Der Kurvenverlauf ist für alle rLF identisch. Er kann als sigmoidal beschrieben und mit der Titration von Asp96 in Zusammenhang gebracht werden [84]. Mit Sinken der Feuchte im Film nahm der pKa-Wert des Übergangs leicht ab. Ferner war ein Anstieg von B_{recovery} mit der relativen Luftfeuchtigkeit zu verzeichnen. Dieser Zusammenhang wird nochmals in **Abb. 17** verdeutlicht. Dort ist die B_{recovery} in Abhängigkeit von der relativen Luftfeuchtigkeit für vier verschiedene pH-Werte dargestellt. Für alle vier pH-Werte war ein Anstieg der B_{recovery} mit sinkendem Wassergehalt zu verzeichnen. Im Bereich zwischen 50 % < rLF < 90 % war der größte Anstieg mit sinkendem Wassergehalt zu verzeichnen. Für rLF < 50 % wird die Änderung geringer und die B_{recovery} scheint sich einem Grenzwert anzunähern. Dieser Effekt ist aber unabhängig vom pH-Wert des umgebenden Mediums.

⁵ Wenn im folgenden davon gesprochen wird, daß die Lebensdauer des M-Intermediates von der relativen Luftfeuchtigkeit abhängig ist, dann ist diese Aussage nur bedingt richtig. Tatsächlich ist die Lebensdauer abhängig von der in der Probe enthaltenen Menge Wasser. Dieser Parameter wird zum einen vom Matrixmaterial und zum anderen von der relativen Feuchte beeinflusst.

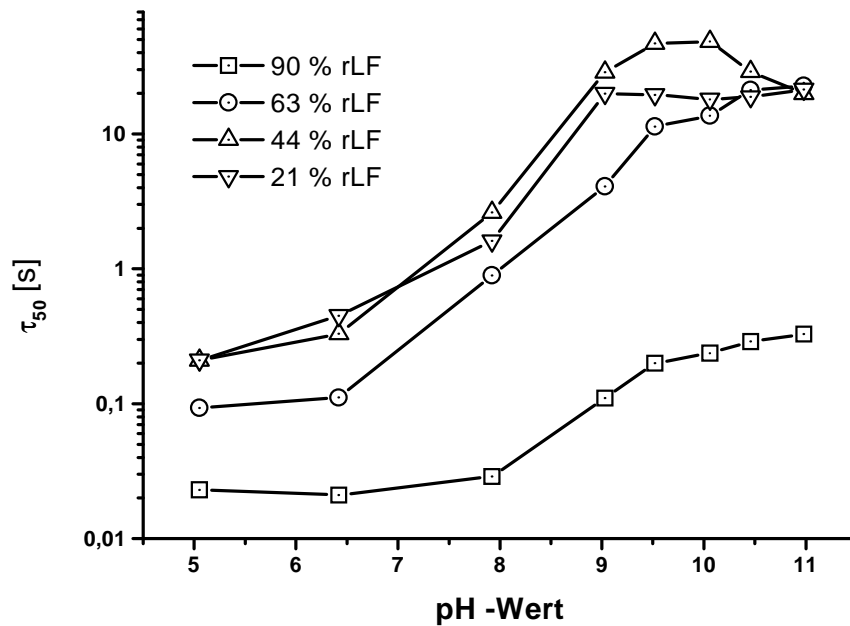


Abb. 16: B-Recovery für BR-WT. τ_{50} ist in Abhängigkeit vom pH-Wert für vier verschiedene relative Luftfeuchtigkeiten dargestellt. Der erwartete sigmoidale Kurvenverlauf in Abhängigkeit vom pH-Wert ist für alle vier rLF identisch. Mit sinkendem Wassergehalt der Probe ist weiterhin ein Anstieg von τ_{50} zu beobachten.

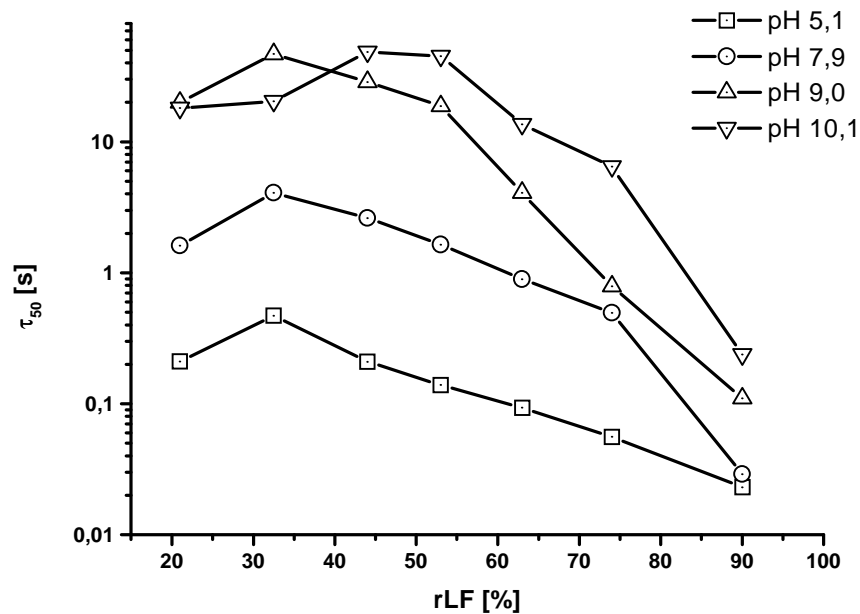


Abb. 17: B-Recovery für BR-WT. τ_{50} ist in Abhängigkeit von der relativen Luftfeuchtigkeit für vier verschiedene pH-Werte dargestellt. Mit sinkendem Wassergehalt ist für alle vier pH-Werte ein Anstieg von τ_{50} zu beobachten, der sich für geringe rLF einem Sättigungswert annähert.

5.3.2.3 Ergebnisse für BR-D96N

Ein völlig anderes Verhalten zeigte die Mutante D96N. Die Abhängigkeit der B_{recovery} in Abhängigkeit vom pH-Wert (**Abb. 18**) stimmte mit dem Verhalten von BR-WT noch prinzipiell überein. Auch hier ist ein sigmoidaler Kurvenverlauf zu beobachten, der abhängig vom pH-Wert des umgebenden Mediums war. Ein komplett anderes Verhalten als bei BR-WT wurde jedoch bei der Abhängigkeit vom Wassergehalt der Probe beobachtet (**Abb. 19**). Ein Anstieg der B_{recovery} mit sinkendem Wassergehalt ist lediglich für niedrige pH-Werte zu beobachten. Für alle anderen pH-Werte ist sie nahezu unabhängig vom Wassergehalt der Probe.

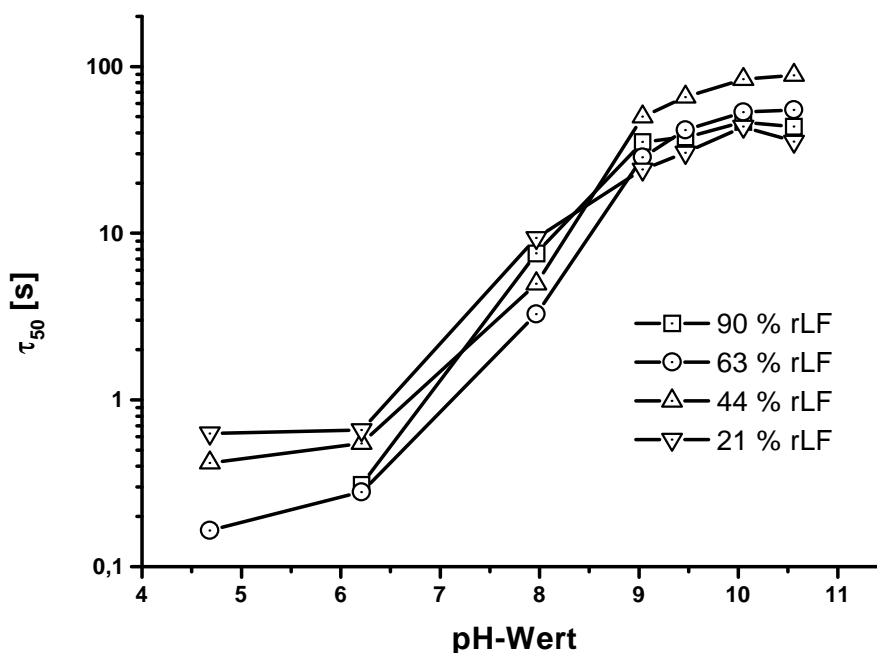


Abb. 18: B_{recovery} für BR-D96N. τ_{50} ist in Abhängigkeit vom pH-Wert für vier verschiedene relative Luftfeuchtigkeiten dargestellt. Der erwartete sigmoidale Kurvenverlauf in Abhängigkeit vom pH-Wert ist für alle vier Luftfeuchten identisch. Im Gegensatz zu BR-WT ist mit sinkender Feuchte kein Anstieg von τ_{50} zu verzeichnen.

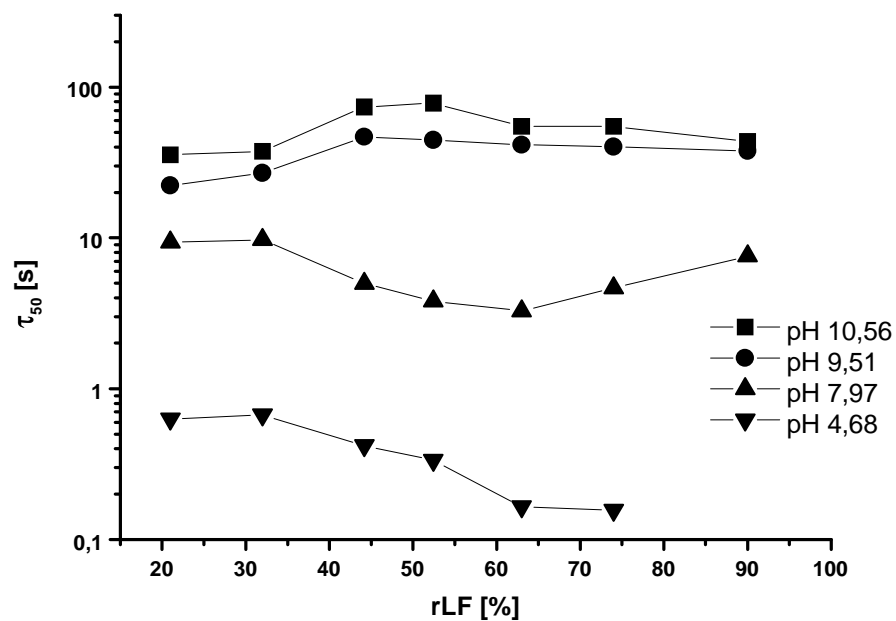


Abb. 19: B_{recovery} für BR-D96N. τ_{50} ist in Abhängigkeit von der relativen Luftfeuchte für vier verschiedene pH-Werte dargestellt. Für die ersten drei pH-Werte ist die B_{recovery} praktisch unabhängig vom Wassergehalt der Probe. Lediglich für niedrige pH-Werte ist ein schwacher Anstieg von τ_{50} zu verzeichnen.

5.3.2.4 Vergleich von BR-WT und BR-D96N

Zur Interpretation und Diskussion der Ergebnisse soll zuerst das Verhalten von BR-WT und BR-D96N verglichen werden. In **Abb. 20** ist τ_{50} gegen den pH-Wert für BR-WT und die Mutante D96N für vier verschiedene Luftfeuchten aufgetragen. Bei rLF = 90 % war das erwartete Verhalten zu beobachten. Die Mutante D96N zeichnete sich durch eine erheblich längere Lebensdauer aus. Der Unterschied betrug bei kleinen pH-Werten in etwa eine Größenordnung, vergrößerte sich dann zu hohen pH-Werten hin kontinuierlich, bis im basischen Milieu ein Unterschied von zwei Größenordnungen zu verzeichnen ist. Diese Tatsache kann mit dem Austausch der Aminosäure an Position 96 erklärt werden. Durch das Entfernen des internen Protonendonators ist die M-Lebensdauer stärker an den pH-Wert des umgebenden Mediums gekoppelt. Soweit entsprachen die Ergebnisse dem beschriebenen Verhalten von BR-WT und BR-D96N in Suspensionen. Mit Reduzierung des Wassergehalts der Probe verschwand der Unterschied zwischen BR-WT und D96N jedoch fast vollständig.

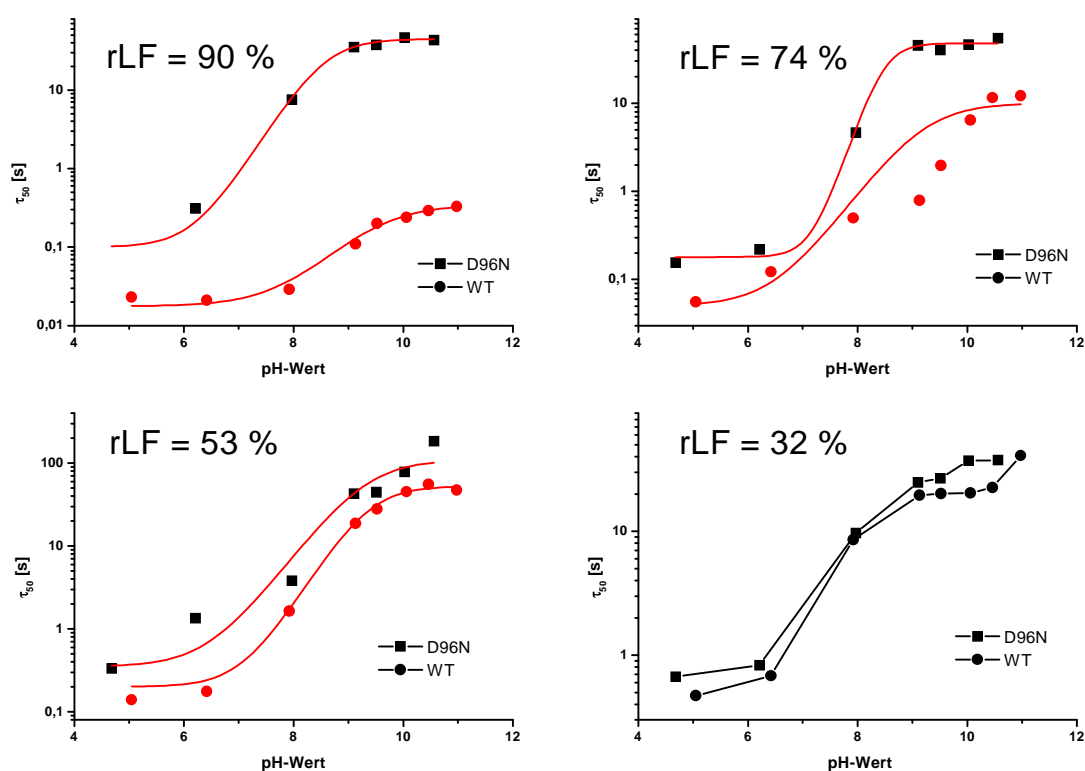


Abb. 20: Vergleich zwischen BR-WT und D96N. Für vier verschiedene Luftfeuchten wurde die B_{recovery} für BR-WT (Kreise) und BR-D96N (Quadrate) in Abhängigkeit vom pH-Wert vergleichend dargestellt. Während bei hohem Wassergehalt der Probe der erwartete Unterschied zwischen BR-WT und D96N zu beobachten ist, wird dieser Unterschied mit sinkender relativer Feuchte immer geringer.

Während bei einer relativen Feuchte von rLF = 72 % und rLF = 50 % noch ein deutlicher Unterschied zwischen BR-WT und D96N zu erkennen war, waren die Kurven bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von rLF = 32 % fast völlig identisch.

5.3.3 Abhängigkeit vom Bleichungsgrad

Nachdem in dem vorherigen Kapitel gezeigt werden konnte, daß der Wassergehalt der Probe die Kinetik der Reaktion beeinflusst, sollte nun untersucht werden, ob die Geschwindigkeit der Reaktion von M nach B von den Startbedingungen abhängig ist. Sollte durch den verminderten Wassergehalt ein Wechsel der Reaktionsordnung von einer Reaktion 1. Ordnung zu einer Reaktion 2. Ordnung stattfinden, dann müßte, theoretischen Überlegungen zufolge, eine Abhängigkeit von B_{recovery} bzw. M_{decay} von der M-Konzentration nachzuweisen sein. Denn danach ist die Halbwertszeit einer Reaktion 2. Ordnung umgekehrt proportional zum Produkt der Geschwindigkeitskonstante der Reaktion und der Anfangskonzentration A_0 :

$$t_{1/2} = \frac{1}{k_2} \cdot \frac{1}{A_0} \quad (15)$$

daher wurde die B_{recovery} und M_{decay} in Abhängigkeit vom Bleichungsgrad der Probe untersucht. Der Bleichungsgrad ist im stationären Zustand von der M-Lebensdauer und der Intensität des eingestrahlt aktinischen Lichtes abhängig. Zur Einstellung unterschiedlicher Bleichungsgrade wurden die Proben für 260 s mit aktinischem Licht bestrahlt, so daß davon ausgegangen werden kann, daß der stationäre Zustand erreicht wurde.

In **Abb. 21** ist die B_{recovery} für BR-D96N (pH = 10,5) für zwei unterschiedliche relative Luftfeuchtigkeiten dargestellt. Im oberen Diagramm (rLF = 95 %) wurde R_B zwischen $R_B = 0,08$ und $R_B = 0,98$ durch variierende Intensitäten I des aktinischen Lichtes ($\lambda = 532 \text{ nm}$, $5 \mu\text{W}/\text{cm}^2 \leq I \leq 250 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) eingestellt. Es war keine Abhängigkeit der B_{recovery} vom Bleichungsgrad festzustellen. Durch die logarithmierte Achse wird zudem verdeutlicht, daß der nach dem Zwei-Zustandsmodell erwartete monoexponentielle Zusammenhang gefunden wurde. Anders im unteren Diagramm (rLF = 30 %). Dort traten die schon zuvor beschriebenen Abweichungen vom monoexponentiellen Verhalten auf. Weiterhin findet man, daß B_{recovery} eine deutliche Abhängigkeit vom Bleichungsgrad zeigte. R_B wurde in diesem Fall zwischen $R_B = 0,2$ und $R_B = 0,8$ durch variierende Intensitäten des aktinischen Lichtes ($150 \mu\text{W}/\text{cm}^2 \leq I \leq 8 \text{ mW}/\text{cm}^2$) eingestellt.

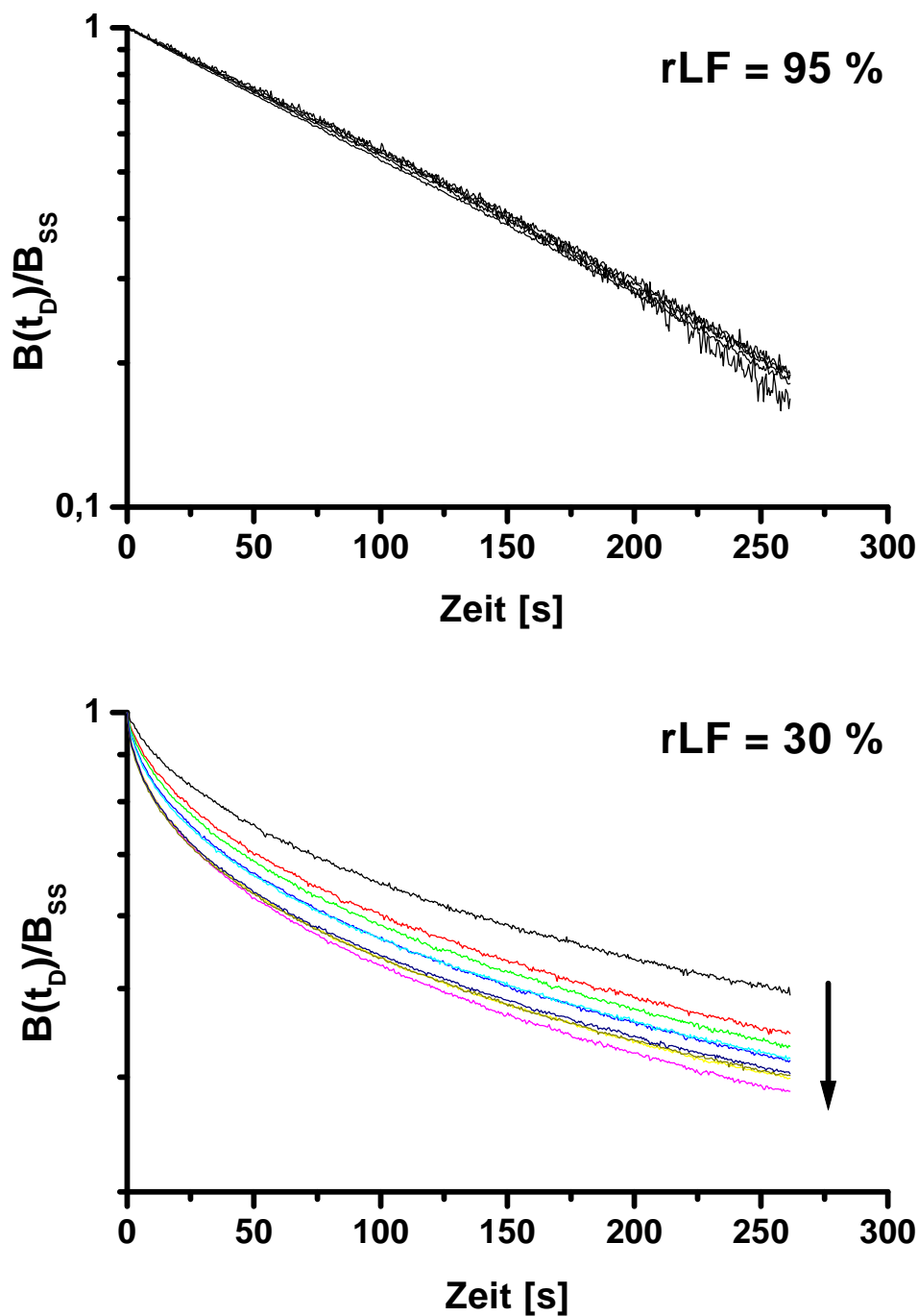


Abb. 21: B_{recovery} für BR-D96N (pH = 10,5) für zwei verschiedene rLF. B_{recovery} ist für zwei relative Luftfeuchtigkeiten in Abhängigkeit vom Bleichungsgrad dargestellt. Im oberen Diagramm (rLF = 95 %) wurde R_B zwischen $R_B = 0,08$ und $R_B = 0,98$ durch variierende Intensitäten ($5\mu\text{W}/\text{cm}^2 \leq I \leq 250\mu\text{W}/\text{cm}^2$) eingestellt. Im unteren Diagramm (rLF = 30 %) wurde der Bleichungsgrad zwischen $R_B = 0,2$ und $R_B = 0,8$ durch variierende Intensitäten des aktinischen Lichtes ($150\mu\text{W}/\text{cm}^2 \leq I \leq 8\text{mW}/\text{cm}^2$) eingestellt. Durch die Reduzierung des Wassergehaltes wird B_{recovery} abhängig von den Startbedingungen.

Von einer Kurve zur nächsten wurde die Intensität ungefähr verdoppelt (oberste Kurve=geringste Intensität), so daß der Pfeil den Anstieg der Intensität verdeutlicht. Mit steigendem Bleichungsgrad nahm die Reaktionsgeschwindigkeit scheinbar zu. Damit wurden die theoretischen Voraussagen für eine Reaktion 2. Ordnung bestätigt. In **Abb. 22** ist für BR-D96N bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von $rLF = 30\%$ M_{decay} gegen B_{recovery} für drei verschiedene Intensitäten aufgetragen. In allen drei Fällen wurde eine Gerade mit einer negativen Steigung von 1 erhalten. Damit wird verdeutlicht, daß neben den Intermediaten B und M keine anderen Intermediate spektroskopisch nachweisbar sind. D.h. die veränderte Kurvenform kann nicht mit der Akkumulation anderer Intermediate erklärt werden.

Um die These einer Reaktion 2. Ordnung zu untermauern, ist in **Abb. 23** die reziproke Halbwertszeit (τ_{50}) des M-Intermediates gegen R_B , die proportional zur M-Konzentration im stationären Zustand ist, für BR-D96N (pH 7,0) für drei verschiedenen relative Luftfeuchten aufgetragen. Die Ergebnisse für höhere pH-Werte und für BR-WT werden hier nicht gezeigt, da

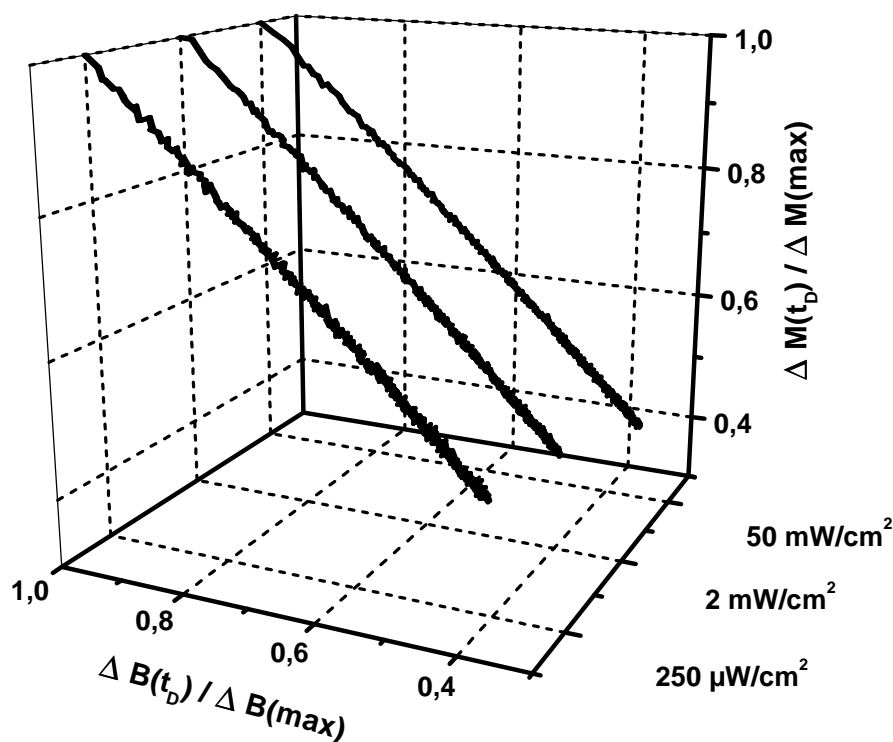


Abb. 22 M_{decay} gegen B_{recovery} für BR-D96N (pH = 10,5) bei $rLF = 30\%$. Für drei verschiedene Intensitäten wird bei der Auftragung eine Gerade erhalten. Damit kann die nennenswerte Akkumulation anderer Intermediate außer B und M ausgeschlossen werden.

sie mit den gezeigten prinzipiell übereinstimmen. Für alle drei rLF, durch unterschiedliche Symbole dargestellt, ergibt die Auftragung eine Gerade und stimmt damit mit den theoretischen Vorhersagen für eine Reaktion 2. Ordnung überein. Für rLF. > 60 % wurde dieses Verhalten nicht gefunden. Dort war die Halbwertszeit unabhängig von der Startkonzentration. Es fällt weiterhin auf, daß alle drei Geraden parallel zueinander verlaufen, d.h. daß sie alle die gleiche Steigung besitzen. Sie unterscheiden sich lediglich durch andere Achsenabschnitte.

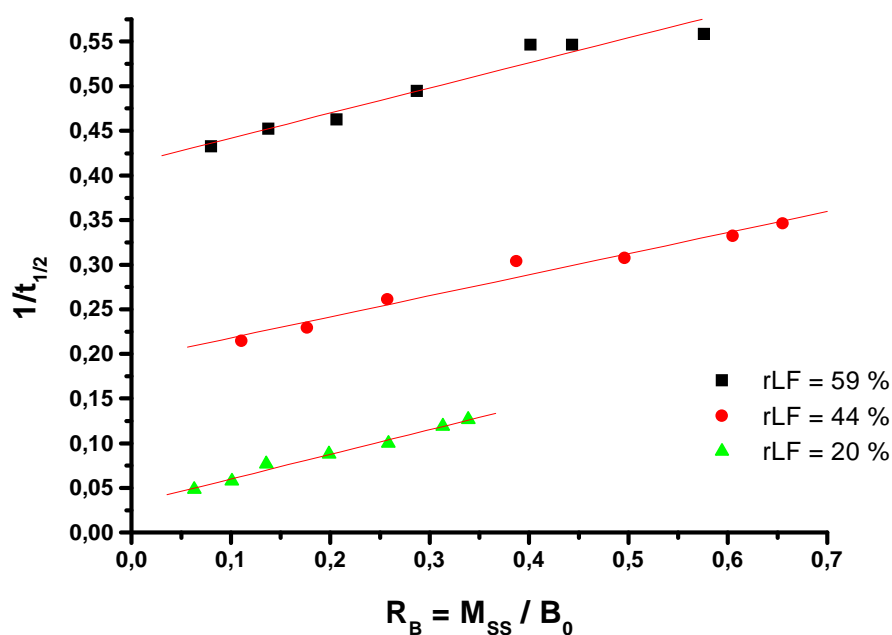


Abb. 23: Reziproke Lebensdauer gegen die M-Konzentration. Die reziproke Lebensdauer des M-Intermediates ist gegen die M-Konzentration nach Belichtung mit aktinischem Licht 532 nm für BR-D96N pH = 7,0 für drei verschiedene relative Feuchten aufgetragen. Die Auftragung zeigt das für eine Reaktion 2. Ordnung erwartete lineare Verhalten zwischen der Halbwertszeit und der Anfangskonzentration des M-Intermediates.

5.3.4 Zusammenfassung und Interpretation

Mit reduziertem Wassergehalt in der Probe traten Abweichungen vom erwarteten monoexponentiellen Verhalten auf. Diese Abweichungen waren unabhängig vom Material (BR-WT oder BR-D96N) und unabhängig vom pH-Wert. Die Abweichungen waren bei M_{decay} und B_{recovery} gleichermaßen zu beobachten, d.h., BR-WT und BR-D96N zeigten bei reduziertem Wassergehalt Abweichungen vom monoexponentiellen Verhalten, obwohl nur zwei Intermediate, nämlich B und M an der Reaktion beteiligt waren.

Diese Tatsachen können erklärt werden, wenn davon ausgegangen wird, daß mit der Reduzierung des Wassergehaltes die Kinetik der Reaktion beeinflußt wird. Bisher wurde für den Zerfall des M-Intermediates immer von einer Reaktion erster Ordnung ausgegangen. Nimmt man jedoch an, daß sich die Reaktionsordnung ändert, von einer Reaktion 1. Ordnung zu einer Reaktion 2. Ordnung, dann kann das gefundene Verhalten erklärt werden.

Geht man von einer Reaktion 2. Ordnung aus, dann stellt sich die Frage, wer die beiden Reaktionspartner der Reaktion sind. Bei dem Übergang von M nach N wird die Schiff'sche Base von Asp96 reprotoniert [85]. Selbst im Falle der Mutante D96N, bei der der interne Protonendonator nicht mehr vorhanden ist (die Reprotonierung findet dann von der cytoplasmatischen Seite statt [86]), fand man bei hohen pH-Werten immer noch das einer Reaktion erster Ordnung entsprechende Verhalten. Dieses Verhalten ändert sich erst, wenn der Wassergehalt der Probe reduziert wurde, d.h. selbst das Fehlen des internen Protonendonators führt nicht zu einer Reaktion 2. Ordnung. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei reduziertem Wassergehalt wird demnach der Transport des Protons zu der Schiff'schen Base. Dabei ist es unerheblich, von wo die Reprotonierung erfolgt (möglicherweise sogar von Asp85). Das wird durch den Vergleich von BR-WT und BR-D96N deutlich. Bei hohem Wassergehalt spielte das Fehlen des internen Protonendonators eine entscheidende Rolle. Die Lebensdauer des M-Intermediates ist im Falle von D96N erheblich verlängert und stärker vom pH-Wert des umgebenden Mediums abhängig. Sank der Feuchtigkeitsgehalt in der Probe, wurde der Einfluß des internen Protonendonators immer geringer. Bei niedrigen Wassergehalten in der Probe hat er fast gar keinen Einfluß mehr (die B_{recovery} von BR-WT und BR-D96N waren nahezu identisch). Die Reprotonierungsgeschwindigkeit der Schiff'schen Base hängt dann nur noch von der Protonenbeweglichkeit im Material ab und der Transport des Protons zur Schiff'schen Base kontrolliert die Geschwindigkeit der Reaktion.

5.4 Einfluß des Wassergehalts auf M-Rise/B-Decay

5.4.1 Einführung

Nachdem im vorangegangenen Kapitel gezeigt werden konnte, daß der Wassergehalt die Kinetik der Reaktion von M nach B stark beeinflusst, soll im folgenden geklärt werden, ob auch die photochemische Reaktion von B nach M durch den Wassergehalt der Probe beeinflusst wird (siehe auch [87]).

Da gezeigt werden konnte, daß die Beeinflussung unabhängig vom pH-Wert ist, wurde BR-WT und BR-D96N lediglich bei zwei verschiedenen pH-Werten (pH = 7,0 und pH = 10,5) und sieben verschiedenen rLF untersucht. Es wurde sowohl die Bleichbarkeit, die das Verhalten im stationären Zustand beschreibt, als auch die Kinetik der Reaktion untersucht.

Die Probenpräparation erfolgte wie in Kapitel 5.2 beschrieben. Die Proben wurden für 260 s mit aktinischem Licht bestrahlt. Die Änderung der B- und M-Konzentration, die proportional zur OD des jeweiligen Intermediates im Absorptionsmaximum ist, wurde gegen die Zeit aufgetragen.

5.4.2 Bleichbarkeit

5.4.2.1 BR-D96N

In **Abb. 24** ist die Bleichbarkeit von BR-D96N bei pH = 7,0 und pH = 10,5 für verschiedene relative Luftfeuchtigkeiten (gekennzeichnet durch unterschiedliche Symbole) dargestellt. In A (oberes Diagramm) werden die Ergebnisse für pH = 7 und in B (unteres Diagramm) die Ergebnisse für pH = 10,5 gezeigt. Dazu wurde die Änderung der OD bei 570 nm gegen die Intensität des aktinischen Lichtes aufgetragen. Die photochemische Anregung der Proben erfolgte mit $\lambda = 532$ nm. Für beide pH-Werte ist das gleiche Verhalten zu beobachten: mit sinkendem Feuchtigkeitsgehalt nahm die Bleichbarkeit ab. Um die gleiche ΔOD zu erzielen war bei niedrigeren Feuchten eine höhere Intensität notwendig. Dieser Sachverhalt soll nochmals in **Abb. 25** verdeutlicht werden. Dort ist das Verhältnis B/B_0 bei 1 mW/cm^2 von BR-D96N für die zwei unterschiedlichen pH-Werte gegen die rLF aufgetragen. Für den hohen pH-Wert findet man eine nahezu lineare Abhängigkeit zwischen der Bleichbarkeit und der relativen Feuchte. Abweichend war das Verhalten der Probe bei pH = 7,0. Zwar nahm auch hier die Bleichbarkeit kontinuierlich mit der relativen Feuchte ab, im Bereich höherer Feuchten war jedoch ein stärkerer Abfall der Bleichbarkeit festzustellen. Vergleicht man die beiden Kurven miteinander, so findet man, daß die Bleichbarkeit bei pH = 10,5 wesentlich größer als bei pH = 7,0 ist. Diese Tatsache ist auf die pH-Wert-Abhängigkeit der M-Lebensdauer zurückzuführen.

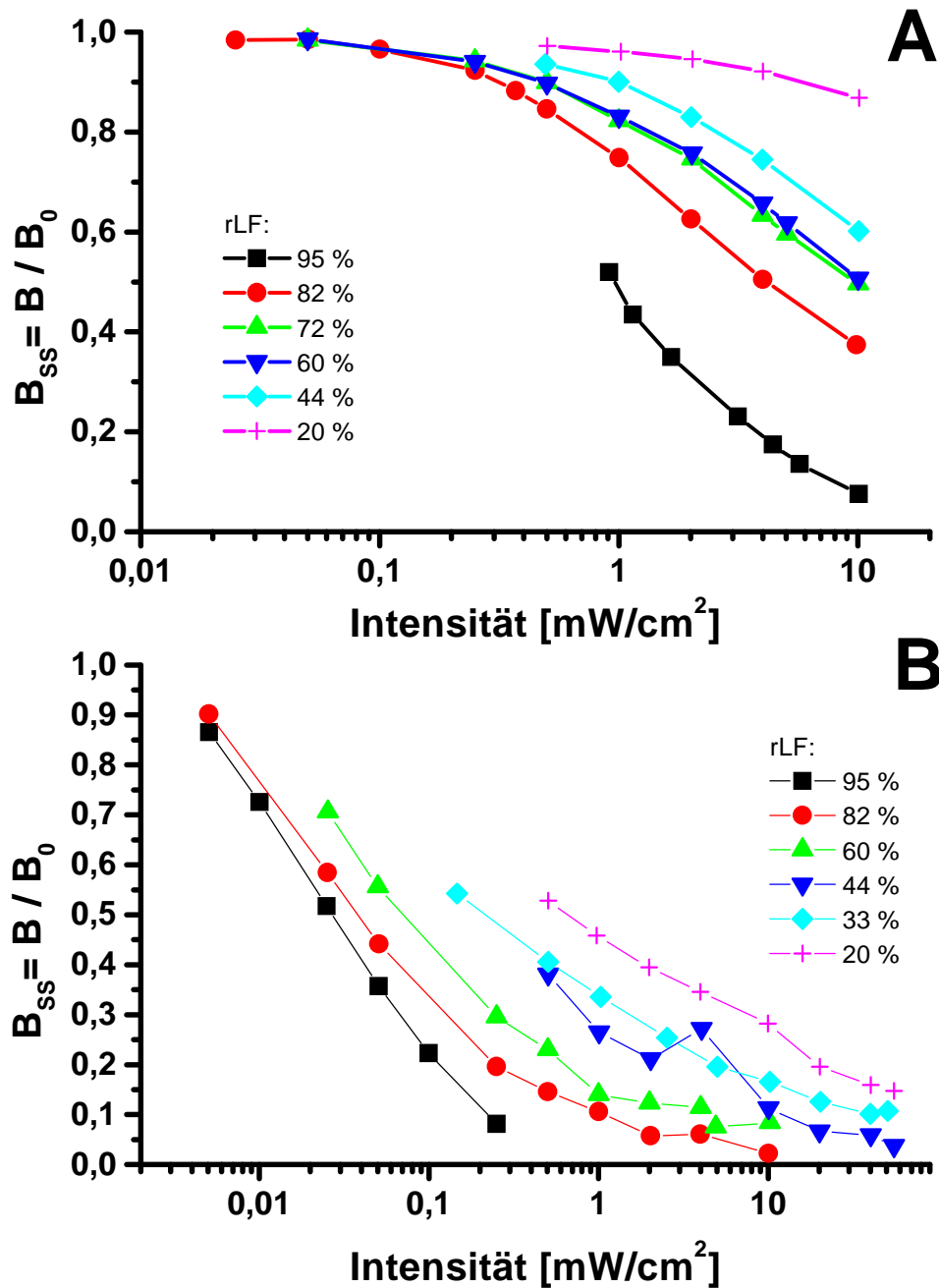


Abb. 24: Bleichbarkeit von BR-D96N. Die Bleichung (B / B_0) ist gegen die Intensität des aktiven Lichtes ($\lambda=532 \text{ nm}$) für BR-D96N bei $\text{pH} = 7,0$ (A) und $\text{pH} = 10,5$ (B) für verschiedene relative Feuchten aufgetragen. Die unterschiedlichen Feuchten sind durch unterschiedliche Symbole dargestellt und die exakten Werte finden sich in der Legende des Diagramms. Bei beiden pH -Werten nimmt die Bleichbarkeit des Systems mit sinkendem Wassergehalt der Probe kontinuierlich ab.

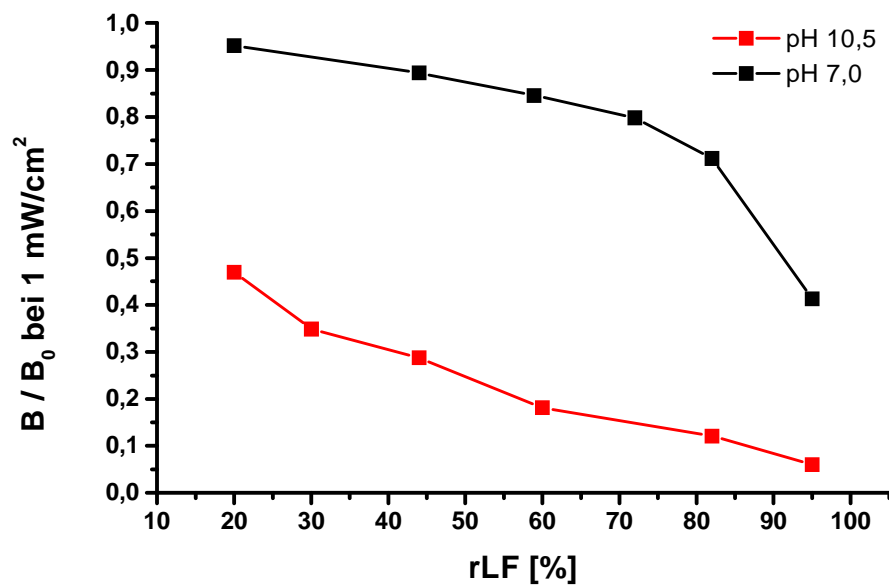


Abb. 25: Bleichbarkeit von BR-D96N bei 1 mW/cm². Die Bleichbarkeit von BR bei zwei verschiedenen pH-Werten ist in Abhängigkeit der relative Feuchte dargestellt. In beiden Fällen nimmt die Bleichbarkeit mit sinkendem Wassergehalt ab.

5.4.2.2 BR-WT

In **Abb. 27** ist die Bleichbarkeiten von BR-WT für zwei verschiedene pH-Werte und verschiedene relative Feuchten dargestellt. Im oberen Diagramm (A) sind die Ergebnisse für pH = 7,0 und im unteren Diagramm (B) die Ergebnisse für pH = 10,5 gezeigt.

Im Gegensatz zur Mutante D96N zeigt die Bleichbarkeit von BR-WT in beiden Fällen ein anderes Verhalten. Zuerst nahm die Bleichbarkeit mit abnehmender Feuchte zu, bis sie bei einem Feuchtigkeitsbereich von 50 - 60 % ihr Optimum erreichte. Wurde die relative Luftfeuchtigkeit dann weiter reduziert, sank die Bleichbarkeit wieder kontinuierlich. Dieser Sachverhalt ist nochmals in **Abb. 26** dargestellt. Dazu wurde das Verhältnis B/B_0 bei einer Intensität von 1 mW/cm^2 gegen die relative Feuchte aufgetragen. Sowohl bei pH = 7 als auch bei pH = 10,5 zeigten die Kurven ein Optimum bei einer Feuchte von 50-60 %. Dieser Kurvenverlauf mit einem Optimum ist ein Indiz dafür, daß die Bleichbarkeit von BR-WT von mindestens zwei gegenläufigen Effekten beeinflusst wird.

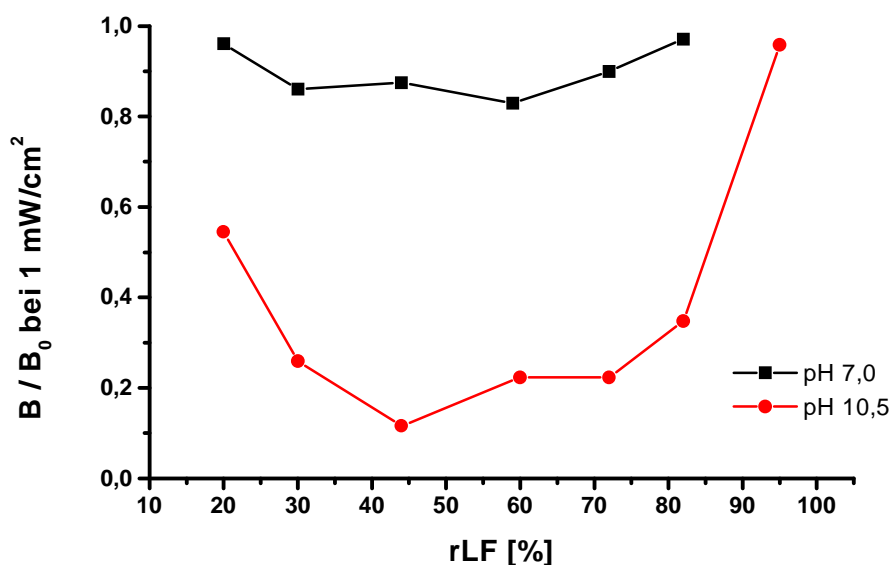


Abb. 26: Bleichbarkeit von BR-WT bei 1 mW/cm^2 . Das Verhältnis B/B_0 bei einer Intensität von 1 mW/cm^2 ist für BR-WT für zwei verschiedene pH-Werte (pH = 7,0 und pH = 10,5) gegen die rLF aufgetragen. In beiden Fällen nimmt die Bleichbarkeit zuerst mit sinkender Feuchte zu und dann wieder ab.

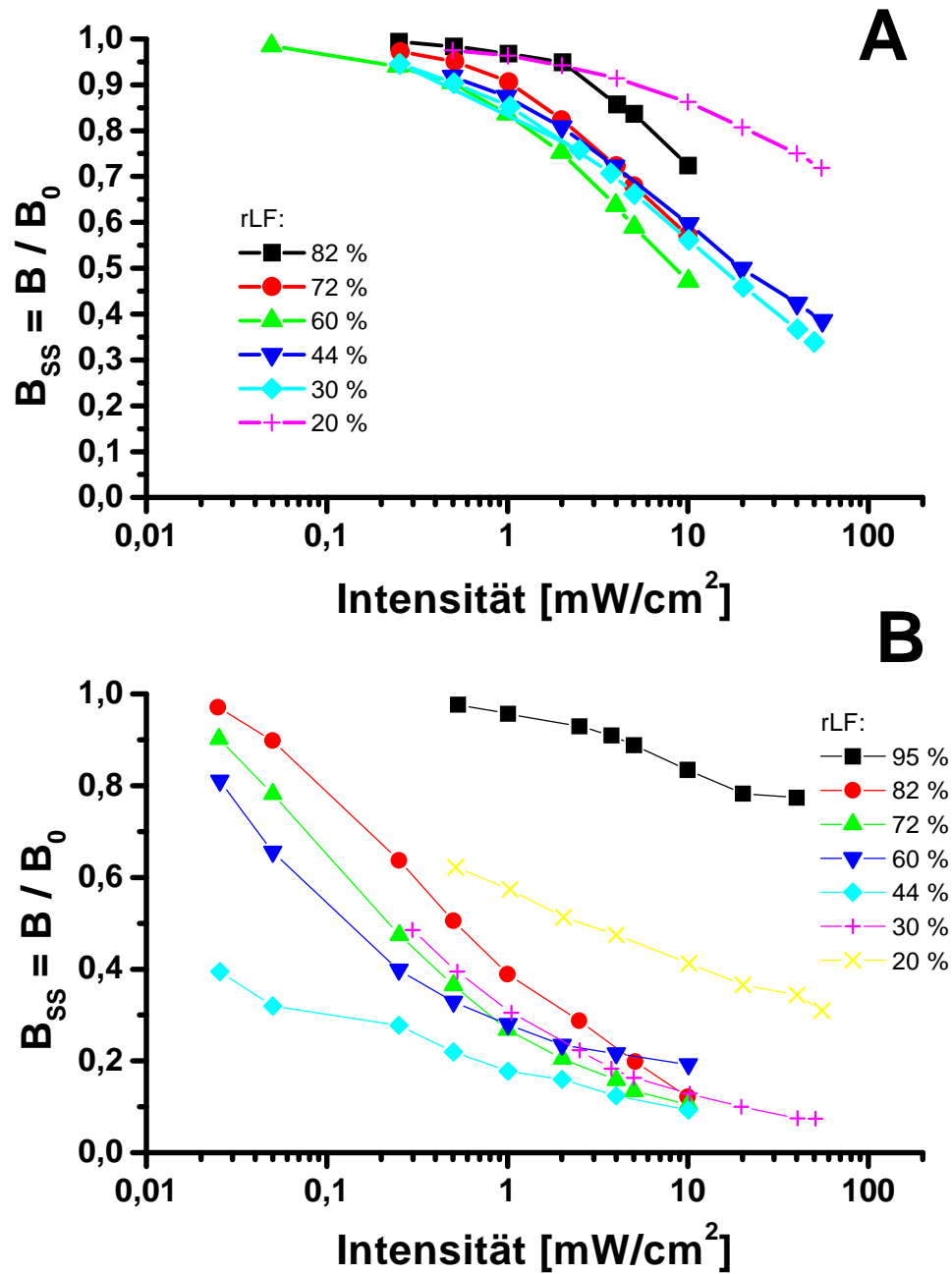


Abb. 27: Bleichbarkeit von BR-WT. Die Bleichbarkeit ist gegen die Intensität des aktinischen Lichtes ($\lambda=532 \text{ nm}$) für BR-WT bei $\text{pH} = 7,0$ (A) und $\text{pH} = 10,5$ (B) für verschiedene rLF aufgetragen. Die unterschiedlichen Feuchten sind durch unterschiedliche Symbole dargestellt, die exakten Werte finden sich in der Legende des Diagramms. Bei beiden pH-Werten nimmt die Bleichbarkeit des Systems mit sinkendem Wassergehalt zuerst zu und dann wieder ab.

5.4.3 Kinetisches Verhalten

Um die Abnahme der Bleichbarkeit mit sinkendem Feuchtigkeitsgehalt der Probe besser verstehen zu können, wurde das kinetische Verhalten von BR-WT und BR-D96N unter photochemischer Anregung mit aktinischem Licht untersucht.

Die Änderung des kinetischen Verhaltens für die Reaktion von B nach M soll in **Abb. 28** verdeutlicht werden. Dort wird der B_{decay} (BR-D96N, pH = 7,0) für rLF = 72 % und rLF = 59 % verglichen. Die unterschiedlichen Feuchten sind durch unterschiedliche Linien gekennzeichnet. (— 59 % rLF und --- 72 % rLF). Unabhängig von der Intensität des aktinischen Lichtes kommt man bei einem Vergleich der Kurven zu identischen Ergebnissen. Im stationären Zustand sind die Kurven bei 72 % r.F. und bei 59% r.F. nahezu identisch, d.h. sie unterscheiden sich nicht in ihrer Bleichbarkeit. Vergleicht man jedoch den Kurvenverlauf, dann stellt man fest, daß die Einstellung des stationären Zustandes abhängig vom Wassergehalt der Probe ist. Mit sinkendem Wassergehalt der Probe nimmt die Zeit, die zur Einstellung des stationären Zustands benötigt wird, zu. Anders ausgedrückt, der stationäre Zustand wird bei reduziertem Wassergehalt der Probe später erreicht, als nach dem simplen Zwei-Zustandsmodell erwartet wird. Um diesen

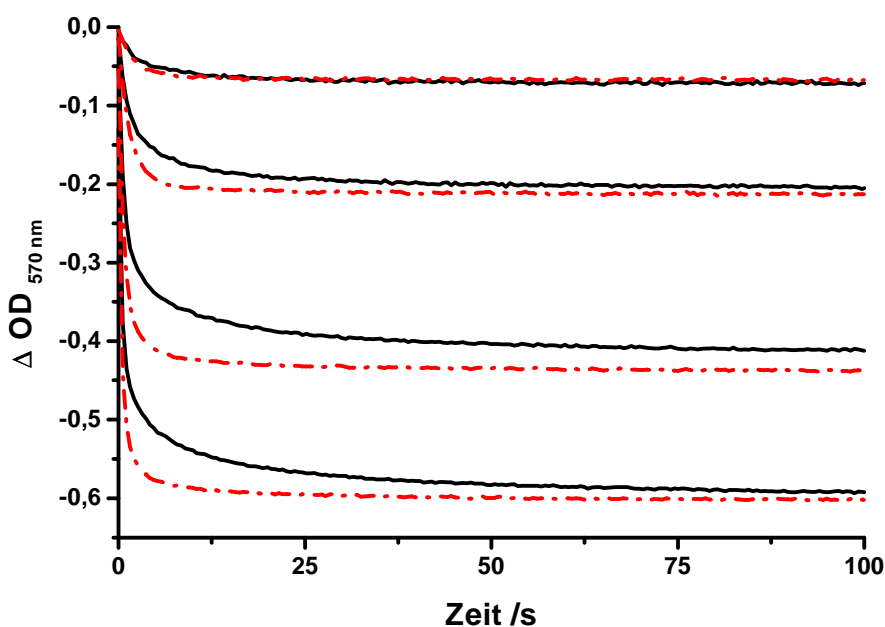


Abb. 28: Vergleich zwischen B-Decay für rLF = 72% und rLF = 59 %. Die Änderung der OD bei 570 nm bei photochemischer Anregung ist für BR-D96N (pH 7,0) für zwei unterschiedliche relative Luftfeuchtigkeiten dargestellt. Die unterschiedlichen Feuchten sind durch unterschiedliche Linien gekennzeichnet (— 59 % rLF und --- 72 % rLF).

Sachverhalt näher zu untersuchen, wurde versucht, die erhaltenen Kurven mit einer theoretischen Kurve anzupassen. In **Abb. 29** wurde der B_{decay} für BR-D96N bei $\text{pH} = 7,0$ und zwei verschiedenen relativen Luftfeuchtigkeiten ($r\text{LF} = 95\%$ und $r\text{LF} = 30\%$) dargestellt. Die Intensität des aktinischen Lichtes wurde zwischen $250 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ und $20 \text{mW}/\text{cm}^2$ variiert. Die exakten Werte sind hinter den Kurven angegeben. Die durchgezogenen Linien sind die Meßwerte, die gestrichelte Linie die daran angepaßte Kurve. Für die Anpassung wurde k_2 aus den entsprechenden M_{decay} -Kurven ermittelt und konstant gehalten ($r\text{LF} = 95\%$: $\tau_{M.} = 202 \text{s}$; $k_2 = 0,005 \text{s}^{-1}$; $r\text{LF} = 30\%$: $\tau_{M.} = 17 \text{s}$; $k_2 = 0,059 \text{s}^{-1}$). Während bei $r\text{LF} = 95\%$ eine gute Übereinstimmung zwischen den Meßwerten und der Theorie erzielt werden konnte, sind bei $r\text{LF} = 30\%$ deutliche Abweichungen zwischen Theorie und Experiment sichtbar. Neben der abweichenden Kurvenform fällt auf, daß bei der Probe mit niedrigem Wassergehalt, eine höhere Intensität notwendig war, um den gleichen Bleichungsgrad zu erreichen. Deshalb wurde in **Abb. 30** die ermittelte photochemische Reaktionsrate gegen die Intensität des aktinischen Lichtes aufgetragen. (Kreise: $r\text{LF} = 95\%$, Quadrate: $r\text{LF} = 30\%$). Die gestrichelten Linien („eye-guiding line“) sollen den linearen Zusammenhang veranschaulichen. Die durchgezogene Linie ist die nach der Theorie erwartete Reaktionsrate. Während bei $r\text{LF} = 95\%$ eine gute Übereinstimmung zwischen Theorie und Praxis gefunden wurde, weichen die Werte für $r\text{LF} = 30\%$ um mindestens eine Größenordnung ab. Dies bedeutet, daß die photochemische Reaktion wird durch den Trocknungsgrad der Probe erheblich beeinflusst. Diese Beeinflussung konnte nicht nur für BR-D96N bei $\text{pH} = 10,5$ sondern ebenfalls bei BR-WT bei $\text{pH} = 7,0$ und $\text{pH} = 10,5$ nachgewiesen werden.

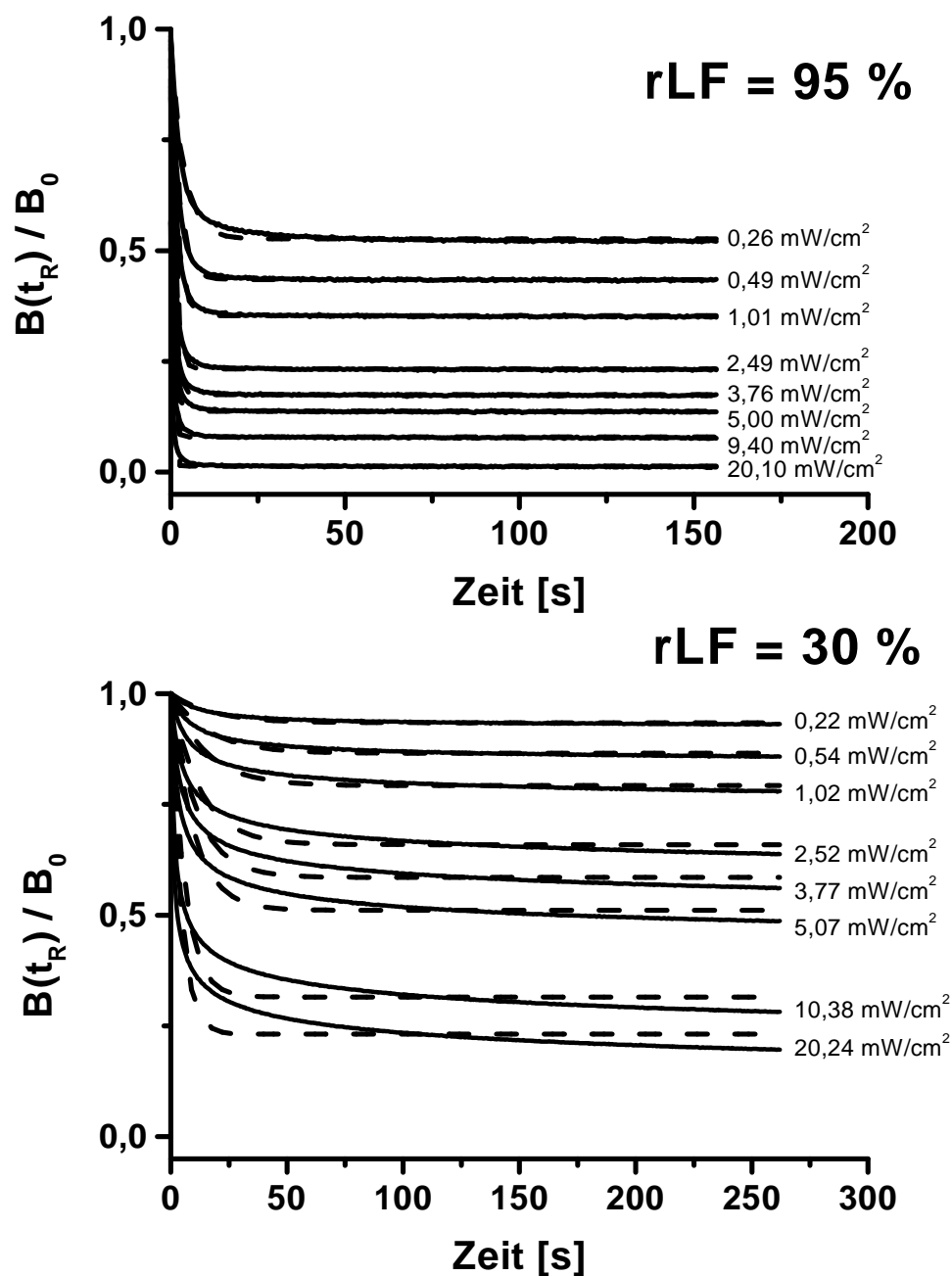


Abb. 29: B_{decay} für BR-D96N bei pH =7,0 und zwei verschiedenen rLF. Die Intensität des aktinischen Lichtes wurde zwischen $250 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ und $20 \text{mW}/\text{cm}^2$ variiert. Die exakten Werte sind hinter den Kurven angegeben. Die durchgezogenen Linien sind die Meßwerte, die gestrichelte Linie die daran angepaßte Kurve. Während bei $rL_f = 95$ eine gute Übereinstimmung zwischen den Meßwerten und der Theorie erzielt werden konnte, sind bei $rL_f = 30 \%$ deutliche Abweichungen zwischen Theorie und Experiment sichtbar.

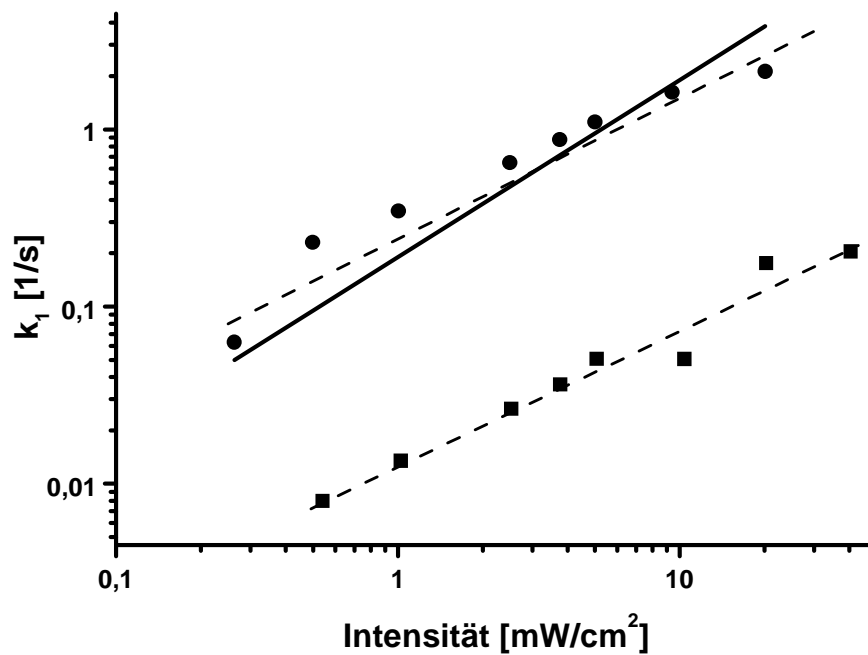


Abb. 30: Photochemische Reaktionsrate k_1 für BR-D96N (pH = 7,0). Die aus dem Fit ermittelte photochemische Reaktionsrate (Abb. 29) ist gegen die Intensität des aktinischen Lichtes aufgetragen (Kreise: $r_{LF} = 95\%$, Quadrate $r_{LF} = 30\%$). Die gestrichelten Linien („eye-guiding Line“) sollen den linearen Zusammenhang veranschaulichen. Die durchgezogene Linie ist die nach der Theorie erwartete Reaktionsrate. Während bei $r_{LF} = 95\%$ eine gute Übereinstimmung zwischen Theorie und Praxis gefunden wird, weichen die Werte für $r_{LF} = 30\%$ um mindestens eine Größenordnung ab.

5.4.4 Interpretation und Diskussion

Es wurde die Lichtempfindlichkeit von BR-WT und BR-D96N in Abhängigkeit vom Feuchtigkeitsgehalt der Probe bei $\text{pH} = 7,0$ und $\text{pH} = 10,5$ untersucht. Die Ergebnisse der Messungen im stationären Zustand und die kinetischen Messungen lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Die Bleichbarkeit von BR-D96N nimmt mit sinkendem Wassergehalt kontinuierlich ab.
- Die Bleichbarkeit von BR-WT nimmt mit sinkendem Wassergehalt erst zu und dann wieder ab, d.h. es wird ein Optimum durchlaufen.
- Bei hohem Wassergehalt der Probe können die erhaltenen Kurven mit dem simplen Zwei-Zustandsmodell beschrieben werden.
- Die erhaltenen Kurven bei niedriger relativer Luftfeuchte können weder für BR-WT noch für BR-D96N mit dem simplen Zwei-Zustandsmodell beschrieben werden.
- Die scheinbare photochemische Reaktionsrate sinkt mit sinkendem Wassergehalt der Probe, d.h. bei niedrigen rLF ist mehr Energie zur Einstellung des gleichen Bleichungsgrads als bei hohem rLF notwendig.
- Weiterhin wurde festgestellt, daß die erhaltenen Spektren einen isosbestischen Punkt aufweisen, sowie daß die Auftragung von B_{decay} gegen M_{rise} eine Gerade ergibt. Damit muß eine nennenswerte Akkumulation spektroskopisch unterscheidbarer Intermediate im Photozyklus ausgeschlossen werden.

Dies bedeutet daß, wie zuvor für B_{recovery} und M_{decay} gezeigt, Abweichungen von der nach dem simplen Zwei-Zustandsmodell erwarteten Kinetik auftreten, obwohl spektroskopisch nur zwei Intermediate nachgewiesen werden können.

Eine Änderung der Quantenausbeute der photochemischen Reaktion durch die Trocknung kann zum einen durch vorangegangene Untersuchungen [88-91] ausgeschlossen werden, zum anderen weil die veränderte Kurvenform mit der Änderung der Quantenausbeute nicht erklärt werden kann.

Berücksichtigt man, daß der Transport des Protons von D96 zur Schiff'schen Base durch den Wassergehalt der Probe beeinflusst wird, dann erscheint es plausibel, daß auf der anderen Seite des Photozyklus der Transport des Protons von der Schiff'schen Base zu D85 ebenfalls in dieser Weise beeinflusst wird.

Problematisch ist bei dieser Betrachtung, daß danach mit sinkendem Wassergehalt eine Akku-

mulation des L-Intermediates zu beobachten sein müßte. Das ist jedoch nicht der Fall. Erklärt werden kann das mit einer photochemischen Rückreaktion des L-Intermediates zu B und/oder einem Gleichgewicht zwischen L und K.

Einmal in L angelangt hätte das Molekül demnach verschiedene Reaktionsmöglichkeiten. Zum ersten bestünde die Möglichkeit das Proton an D85 abzugeben. Es würde so gemäß dem normalen Photozyklus zu M^I . Da dieser Reaktionsweg aufgrund des reduzierten Wassergehalts der Probe jedoch verlangsamt ist, ist es ebenfalls denkbar, daß es durch ein weiteres Photon photochemisch angeregt wird, und aus dem angeregten Zustand zurück zum Ausgangszustand B_{570} reagiert. Eine weitere Möglichkeit wäre das Einstellen eines Gleichgewichts mit dem K-Intermediat ein, wo es dann photochemisch ebenfalls angeregt und zurück in den Ausgangszustand (B_{570}) zurückreagieren könnte [92]. Unabhängig vom Reaktionsweg sind alle beschriebenen Reaktionswege so schnell, daß eine Akkumulierung des L-Intermediates nicht zu beobachten wäre.

Legt man diesen Erklärungsansatz zu Grunde, ist auch das unterschiedliche Verhalten der Lichtempfindlichkeit von BR-WT und BR-D96N zu verstehen. Für BR-D96N konnte gezeigt werden, daß die M-Lebensdauer nicht bzw. nur sehr gering vom Trocknungsgrad der Probe abhängig ist. BR-WT zeigt dagegen eine starke Abhängigkeit der Lebensdauer vom Trocknungsgrad (s. Kap. 5.3). Für BR-D96N nimmt die Lichtempfindlichkeit der Probe deshalb ab, weil die Hinreaktion durch den reduzierten Wassergehalt behindert wird. Im Gegensatz dazu nimmt die Lichtempfindlichkeit von BR-WT erst zu, da die M-Lebensdauer zunimmt. Bei relativen Feuchten bis ca. 60 % kann dieser Effekt, die Behinderung der photochemischen Reaktion überkompensieren. Sinkt der Wassergehalt der Probe weiter, dann kontrolliert die Hinreaktion die Lichtempfindlichkeit der Probe.

5.5 Modifiziertes Photozyklusmodell

Alle vorangegangenen Messungen zeigen, daß das Zwei-Zustandsmodell bei reduziertem Wassergehalt zu keinen verlässlichen Aussagen mehr führt. Deshalb soll im folgenden ein Modell vorgestellt werden, das die Verhältnisse bei reduziertem Wassergehalt qualitativ beschreibt.

Für den M-Zerfall wird davon ausgegangen, daß die Reprotonierung der Schiff'schen Base weder von Asp96, noch von der zytoplasmatischen her Seite erfolgt. Mit Neutronenbeugungsexperimenten konnte gezeigt werden [93], daß der M^I Zustand, bei niedrigen Luftfeuchten

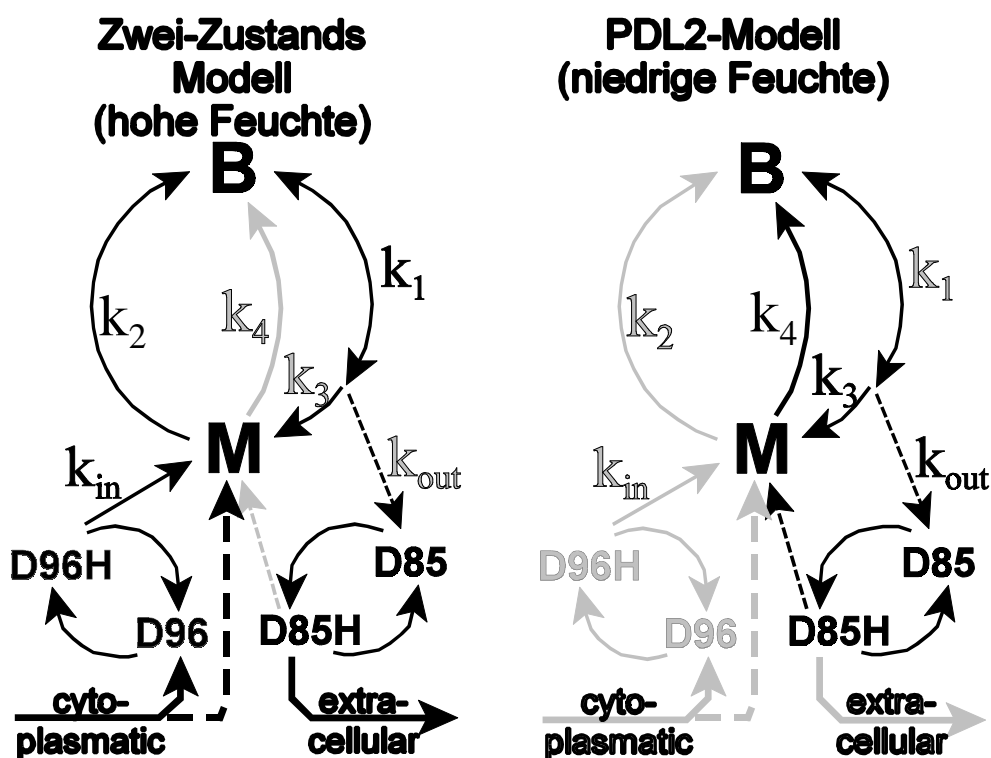


Abb. 31: Zwei-Zustandsmodell für BR bei hohem und bei niedrigem Wassergehalt. In Abhängigkeit von der rel Feuchte bestimmen unterschiedliche Reaktionswege das kinetische Verhalten von BR. Der „aktive“ Teil des Photozyklus ist schwarz gezeichnet, während der „stille“ Teil grau gezeichnet wurde. Der linke Photozyklus (hohe Luftfeuchtigkeit) entspricht dem konventionellen Zwei-Zustandsmodell. Da im rechten Zyklus (bei niedrigem Wassergehalt) die Kinetik durch die Diffusion der Protonen festgelegt ist, wird er PDL-2 Modell (Protonendiffusions limitiertes Zwei Zustandsmodell) genannt.

eingefroren werden kann, d.h. der molekulare Schalter (Übergang M^I nach M^H), der bewirkt, daß das Stickstoffatom der Iminbindung einmal von der extrazellulären Seite und dann von der zytoplasmatischen Seite zugänglich ist, ist außer Kraft gesetzt. Daß die Reprotonierung von der extrazellulären Seite geschieht, wird auch durch die gezeigten Experimente bestätigt.

Unabhängig vom Bleichungsgrad erhält man bei der Auftragung der reziproken M-Konzentration gegen die Zeit eine Gerade. D.h. aber, daß beide Reaktionspartner in gleichen bis ähnlichen Konzentrationen vorliegen müssen. Beim Übergang von L nach M wird aber ein Proton zu Asp85 auf der extrazellulären Seite abgegeben.

Bei der photochemischen Reaktion von B nach M wird die Abgabe des Protons im Schritt von L nach M¹ durch den reduzierten Wassergehalt verlangsamt. Das L Intermediat kann dann ein Photon absorbieren. Selbst in dem Fall daß es photochemisch nicht direkt zu B zurückreagiert, fungiert es als „Photonenverschwender“. Die photochemische Reaktion von B nach M wird dadurch, weniger effizient.

Da bei reduzierter Feuchte die Gesamtkinetik von der Diffusion der Protonen bestimmt wird, wird das neue Modell als Protonendiffusions-limitierendes Zwei-Zustandsmodell (PDL-2) bezeichnet.

5.6 Zusammenfassung

Die vorgestellten Arbeiten hatten zum Ziel, neue Erkenntnisse für Anwendungen mit Bakteriorhodopsin zu gewinnen. Es wurde der Einfluß des Wassergehalts auf die M-Lebensdauer und die photochemische Bleichungsreaktion in BR-Schichten untersucht. Neben dem Wassergehalt wurde zusätzlich noch der pH-Wert variiert.

Es wurde festgestellt, daß sich der Trocknungsgrad unterschiedlich auf BR-WT und BR-D96N auswirkt. Während er bei BR-WT eine Verlängerung der Lebensdauer bewirkt, ist er praktisch ohne Einfluß auf die Lebensdauer von BR-D96N. Der Einfluß des Wassergehalts der Probe ist gleichzeitig unabhängig vom pH-Wert, d.h. der pH-Wert und der Trocknungsgrad beeinflussen die Lebensdauer durch unterschiedliche.

Mit sinkendem Wassergehalt nimmt die Effizienz der photochemischen Hinreaktion ab. Dieser Effekt kann bei BR-WT anfangs durch die steigende M-Lebensdauer kompensiert werden. Für BR-D96N dagegen nimmt die Bleichbarkeit, die ein Maß für die Effizienz darstellt, kontinuierlich mit sinkendem Wassergehalt ab.

Durch die Reduzierung des Wassergehalts wird, die Kinetik der Reaktion von M nach B (und *vice versa*) beeinflusst. Es findet ein Wechsel der Reaktionsordnung von einer Reaktion 1. Ordnung zu einer Reaktion 2. Ordnung statt. Dieser Wechsel konnte durch mehrere, unabhängige Experimente zweifelsfrei bewiesen werden. Anhand dieser Experimente konnte ein Photozyklusmodell für reduzierten Wassergehalt aufgestellt werden. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist in diesem Modell der Transport des Protons zu der Schiff'schen Base bzw. von ihr weg. Er wird bei hohen Trocknungsgraden durch das umgebende Matrixmaterial festgelegt. Die Materialeigenschaften (interner Protonendonator ja/nein) spielen in diesem Fall eine untergeordnete Bedeutung.

Neben dieser wissenschaftlichen Fragestellung hat der Wechsel der Reaktionsordnung eine praktische Bedeutung für die Charakterisierung der BR-Filme. Die Angabe einer Lebensdauer ist im Fall von Filmen mit reduziertem Feuchtigkeitsgehalt nicht mehr ausreichend, da die Lebensdauer entscheidend von den Startbedingungen abhängt. Diese bedeutet, daß die Charakterisierung von Filmen, wie sie in der holographischen Interferometrie genutzt werden, durch diese Tatsache zusätzlich erschwert wird.

6 EINSATZ VON BAKTERIORHODOPSIN-FILMEN IN DER HOLOGRAPHISCHEN INTERFEROMETRIE

6.1 Einführung

Nachdem im vorangegangenen Kapitel die photochemischen Eigenschaften von Bakteriorhodopsin untersucht wurden, sollen die Ergebnisse nun in der Holographischen Interferometrie genutzt werden.

Wird ein Objekt photographiert, dann werden nur Informationen über die Amplitude beziehungsweise Intensität der Wellen in der lichtempfindlichen Schicht gespeichert. Die Information über die Phasenunterschiede der Wellen geht dabei verloren und damit auch die Informationen über die Räumlichkeit des Objektes [94].

Bei der Holographie wird die Phaseninformation der Wellen ebenfalls gespeichert, weshalb es möglich ist, bei der Rekonstruktion einen räumlichen Eindruck des Objektes zu erzeugen. Zur Aufnahme eines Hologramms wird ein Objekt mit dem sogenannten Objektstrahl ausgeleuchtet. Das reflektierte Licht des Objektes fällt auf einen holographischen Film. Zur Aufnahme der Phaseninformation ist der sogenannte Referenzstrahl notwendig.

Um eine definierte Referenzphase für die Objektstrahlen liefern zu können, müssen Objektstrahl und Referenzstrahl kohärent sein, d.h. sie müssen aus einer Lichtquelle stammen. Setzt man gleiche Polarisationsrichtung von Objekt und Referenzstrahl voraus, dann können Referenz und Objektwellen miteinander interferieren, d.h. in der holographischen Schicht wird nicht die Intensitätsverteilung der Objektwelle gespeichert, sondern die des Interferogramms aus Objekt- und Referenzwelle am Ort der holographischen Schicht [95].

Zur Rekonstruktion des Objektes ist dann nur noch die Referenzwelle notwendig. Sie rekonstruiert dann das sogenannte virtuelle Objektbild.

Aufgrund ihrer zeitlichen und räumlichen Kohärenz, ihrer Polarisierung und ihrer monochromatischen Strahlung eignen sich Laser hervorragend zur Aufzeichnung von Hologrammen. Es ist daher nicht verwunderlich, daß die technische Durchführung der Holographie stark an die Konstruktion von Lasern gekoppelt war⁶.

⁶ Die Holographie wurde mehr als ein Jahrzehnt vor der Erfindung des Lasers von Garbor 1948, zur Verbesserung elektronenmikroskopischer Aufnahmen entwickelt [96]. Mit den verfügbaren Lasern gelangen 1962 die Aufnahmen der ersten dreidimensionalen Bilder auf Photoplaten im sichtbaren Wellenlängenbereich [97].

Bei der normalen Holographie wird das Objekt vor der Rekonstruktion entfernt. Wird das Objekt dagegen nicht entfernt erhält man zwei Wellenfronten. Die aktuell vom Objekt gestreute und die rekonstruierte Wellenfront. Da beide Wellen kohärent sind, können sie interferieren. Unterscheiden sich die Oberflächen nun in ihrer Lage, erhält man ein Abbild des Objektes, das mit Interferenzstreifen gleichen Gangunterschieds überzogen ist. Diese als holographische Interferometrie bezeichnete Methode ist ein kohärent-optisches Verfahren zur kontaktlosen Messung von Oberflächenverformungen. Die von mehreren Autoren vorgeschlagene Meßmethode [98-100] hat mittlerweile vielfältige Anwendungsmöglichkeiten gefunden. Sie reichen von der industriellen Fertigungs- und Qualitätskontrolle bis hin zur Testung endoprothetischer Komponenten.

Neben den optischen Komponenten spielt das holographische Aufzeichnungsmedium eine entscheidende Rolle. Alternativ zu den herkömmlichen Silberhalogenidfilmen wurde schon frühzeitig die Verwendung von Bakteriorhodopsin vorgeschlagen [101] und die prinzipiellen Möglichkeiten aufgezeigt. Als reversibles Material, das keine naßchemische Entwicklung benötigt, ist es den herkömmlichen Materialien immer dann überlegen, wenn in kurzer Zeit mehrere Analysen, z.B. bei Untersuchungen in einer Serienproduktion, durchgeführt werden sollen.

Im Rahmen des BMBF-Projektes BAROMESS sollte ein Prototyp einer Interferometrikamera auf BR-Basis entwickelt werden und der prinzipielle Einsatz unter industrienahen Bedingungen aufgezeigt werden. Aus diesem Grund mußten Bakteriorhodopsin-Filme für die holographische Interferometrie optimiert werden. Zum einen sollte der Einsatz von großflächigen Filmen in der Holographischen Interferometrie demonstriert werden. Zum anderen sollte die Lichtempfindlichkeit der Filme gesteigert werden.

Dazu wurde die Abhängigkeit der Lichtempfindlichkeit von der relativen Feuchte, des pH-Wertes und vom Material (BR-WT und BR-D96N) untersucht.

6.2 Photochemische Optimierung von Bakteriorhodopsin-Filmen

Die unter Anwendungsgesichtspunkten wichtigen Parameter zur Optimierung von BR-Filmen sind in **Tabelle 16** für BR-WT und BR-D96N bei einem pH-Wert von 10,5 für fünf verschiedene relative Luftfeuchtigkeiten zusammengefaßt. Unabhängig vom Material ist ein Einsatz von BR-Filmen nur bei diesem hohen pH-Wert denkbar, weshalb andere pH-Werte nicht berücksichtigt wurden. Die grau unterlegten Spalten stellen die Meßgrößen dar, während die anderen Felder daraus abgeleitete Größen sind. Die Abhängigkeit der M-Lebensdauer für BR-WT und BR-D96N wurden in Kap. 5.3 diskutiert und entspricht den dort gezeigten Ergebnissen. Für BR-D96N bei $rLF = 95\%$ stimmen die theoretischen Aussagen für R_B und E_{50} gut mit den experimentell gefundenen überein. Mit reduziertem Wassergehalt der Probe treten allerdings Abweichungen zwischen Theorie und Experiment auf. Für BR-WT findet man im Bereich mittlerer Feuchten ebenfalls gute Übereinstimmung zwischen Theorie und Praxis für E_{50} . Bei niedrigen Wassergehalten nehmen die Abweichungen aber auch hier zu. Die Ursachen für das Verhalten von BR-WT und BR-D96N ist der Wechsel der Kinetik, der mit dem Übergang von dem Zwei-Zustandsmodell zu dem PDL2-Modell beschrieben werden kann (Kapitel 5.5).

Bei niedrigem Wassergehalt der Probe nimmt die Sensitivität bzw. die Lichtempfindlichkeit sowohl für BR-WT als auch für BR-D96N demzufolge ab. Dieser Sachverhalt wird besonders durch den Parameter S_{50} wiedergegeben. Dabei handelt es sich um das Produkt aus der Zeit, die benötigt wird, um $B(t_p) = 0,5 B_0$ einzustellen und der Intensität des aktinischen Lichtes.

In **Abb. 32** ist S_{50} in Abhängigkeit von der Intensität des aktinischen Lichtes für BR-WT und BR-D96N für jeweils zwei unterschiedliche Feuchten dargestellt. In beiden Fällen ist zu sehen, daß die Lichtempfindlichkeit des Materials mit sinkendem Wassergehalt abnimmt. Gerade bei niedrigen Intensitäten, die bei einer Holographischen Aufnahme von entscheidender Bedeutung sind, ist der Rückgang der Lichtempfindlichkeit besonders stark ausgeprägt.

Aus den vorhandenen Ergebnissen kann folgende Optimierungsstrategie für BR-Filme abgeleitet werden. BR-D96N ist BR-WT zum einen in der Lichtempfindlichkeit überlegen, zum anderen gestaltet sich bei der Filmproduktion die dauerhafte Einstellung einer hohen Luftfeuchte wesentlich einfacher als die Einstellung der für BR-WT optimalen Luftfeuchte, d.h. BR-D96N ist BR-WT vorzuziehen.

Tabelle 16 Parameter zur Charakterisierung von BR-Filmen in Abhängigkeit der relativen Luftfeuchtigkeit

BR-D96N, pH 10,5, 20°C, I = 1 mW/cm ² , λ = 532 nm											
rLF	M _{decay} Kurvenform	τ ₅₀ [s]	τ _M [s]	γ	R _B [%]		E ₅₀ [mJ/cm ²]		S ₅₀ [mJ/cm ²]		
					rLF theor.	experim.	theor.	experim.	1 mW/cm ²	100 μW/cm ²	
95 %	1. Ordnung	136,0	196,2	53,86	98%	98%	2,45	2,78	2,46	2,79	
82 %	1. Ordnung	133,0	191,9	52,67	98%	89%	2,46	3,08	2,99	4,87	
72 %	(Übergang)	129,8	187,3	51,40	98%	88%	2,46	3,48	3,54	5,55	
59 %	2. Ordnung	142,1	203,0		86%		2,47	4,05	4,03	7,67	
30 %	2. Ordnung	150,2	216,7	59,48	98%	66%	2,47	6,76	6,95	33,62	

BR-WT, pH 10,5, 20°C, I = 1 mW/cm ² , λ = 532 nm											
rLF	M _{decay} Kurvenform	τ ₅₀ [sec]	τ _M [sec]	γ	R _B [%]		E ₅₀ [mJ/cm ²]		S ₅₀ [mJ/cm ²]		
					theor.	experim.	theor.	experim.	1 mW/cm ²	100 μW/cm ²	
95 %	1. Ordnung	0,3	0,5	0,13	12%	5%	0,50	2,68	---	---	
82 %	1. Ordnung	18,7	27,0	8,9%				2,64	---	---	
(Übergang)		41,7	60,2	16,47	94%	84%	2,37	3,01	3,98	---	
59 %	(Übergang)	75,4	108,8	29,86	97%	81%	2,43	4,16	5,19	---	
30 %	2. Ordnung	147,4	212,7	58,37	98%	78%	2,47	5,16	9,85	---	

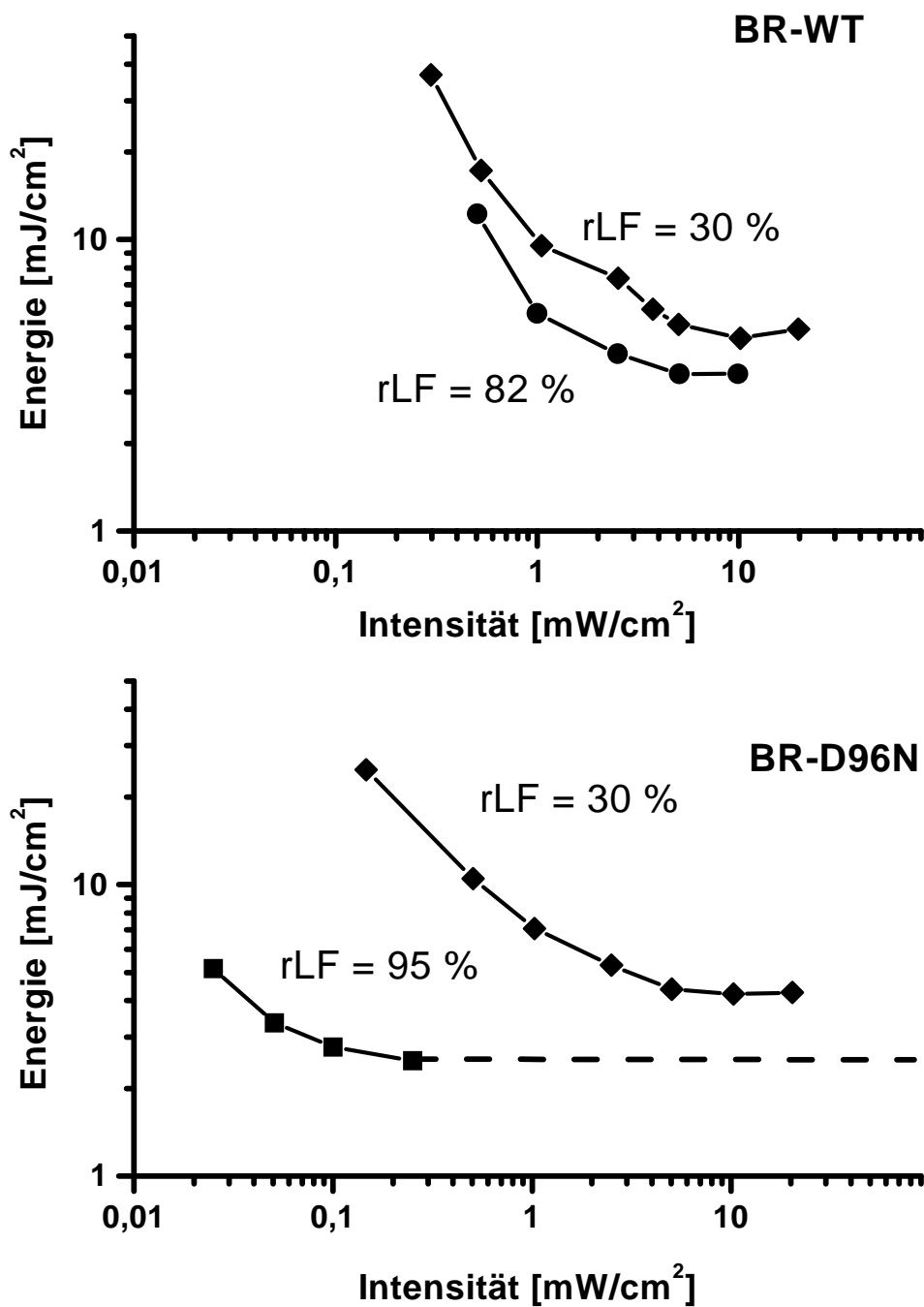


Abb. 32: S_{50} für BR-WT und D96N bei jeweils zwei unterschiedlichen Feuchten. Die Auftragung verdeutlicht den Rückgang der Lichtempfindlichkeit mit sinkendem Wassergehalt unabhängig vom Material. Gerade bei niedrigen Intensitäten, die für die Aufzeichnung eines Interferogramms ausschlaggebend sind, ist der stärkste Anstieg zu beobachten.

6.3 Holographische Interferometrie mit Bakteriorhodopsin-Filmen

6.3.1 Meßaufbau

In **Abb. 33** ist der Aufbau, in dem die Bakteriorhodopsin Filme zum Einsatz kommen sollen, schematisch dargestellt. Hierbei erfolgt die Aufnahme des Hologramms in Reflexion. Das Licht eines frequenzverdoppelten Nd:YVO₄ Lasers (VERDI, Coherent) wird mit einem Strahlteiler (BS) in den Objektstrahl und den Referenzstrahl geteilt. Der Objektstrahl leuchtet das zu untersuchende Objekt nahezu homogen aus. Der Referenzstrahl, dessen Polarisationsrichtung über eine $\lambda/2$ -Platte eingestellt werden kann, wird ebenfalls aufgeweitet (BE2). Sowohl Referenz- als auch Objektstrahl sind über einen Shutter getrennt zu öffnen und zu schließen, so daß Doppelbelichtungs-, Zeitmittelungs- und Echtzeitaufnahmen möglich sind. Die Aufzeichnung des Hologramms erfolgt mit einer CCD-Kamera (KP F100, Hitachi, Auflösung 1300 x 1028 Pixel). Der Polarisationsfilter vor dem Objektiv der Kamera diene zur Verbesserung des Signal-Rauschverhältnisses [102].

Wichtig ist, daß zwischen dem zu untersuchenden Objekt und dem BR-Film optisches Bauteil zu finden ist, da diese die Auflösung des Systems limitieren würde. Grundvoraussetzung bei der Aufzeichnung ohne Linse ist die Verwendung eines großflächigen BR-Films. Eine genaue Beschreibung des Aufbaus und der Nutzen von großen BR-Filmen ist in [103] zu finden.

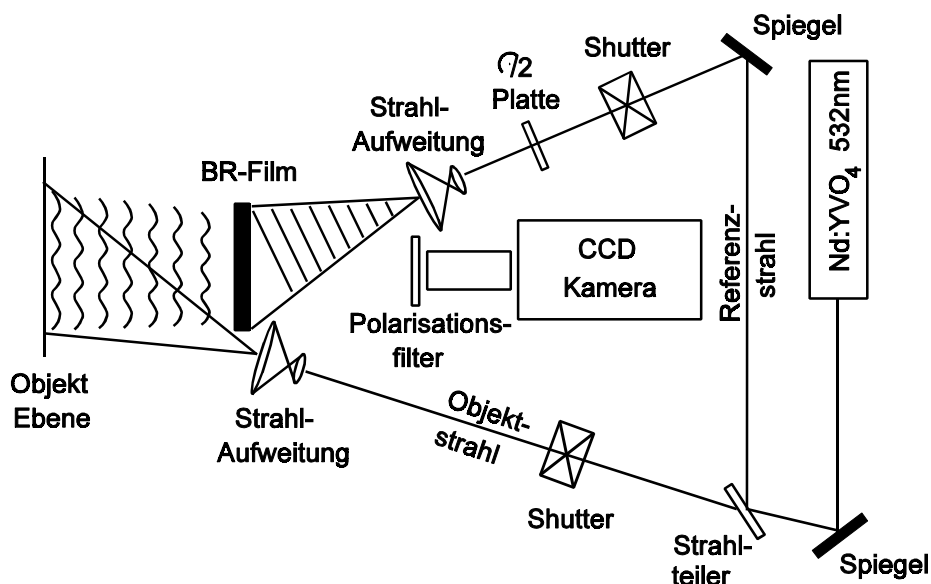


Abb. 33: Schematischer Meßaufbau zur holographischen Interferometrie. Das Licht eines Nd:YVO₄ Lasers wird mit einem Strahlteiler (BS) in Objekt- und Referenzstrahl geteilt. Die Aufnahme des Interferogramms geschieht bei diesem homodynen Aufbau in Reflexion. Zwischen dem zu untersuchenden Objekt und dem Aufzeichnungsmedium (dem BR-Film) ist keine weitere optische Komponente zu finden („lensless recording“).

6.3.2 Großflächige BR-Filme

Der Vorteil von großflächigen BR-Filmen ist, daß sie die Verwendung einer Linse (oder eines anderen optischen Bauteils) in der Objektebene überflüssig machen. Damit wird die Auflösung des Systems nicht von der optischen Komponente limitiert (Linsen haben typischerweise eine Auflösung von bis zu 300 Linien/mm) und die volle Auflösung von BR mit 5000 Linien/mm kann ausgenutzt werden. In **Abb. 34** ist ein BR-Film mit einer freien Apertur von 90 mm x 90 mm zu sehen. Der Film hat eine Dicke von etwa 100 µm, ist von beiden Seiten mit einer Glasplatte geschützt und in eine Fassung mit den Außendimensionen von 120 mm x 120 mm montiert. Der Film sollte bei der interferometrischen Untersuchung von keramischen Motor-



Abb. 34: BR-Film mit einer freien Apertur von 90 mm x 90 mm. Der Film hat eine Dicke von etwa 100 µm, ist von beiden Seiten mit einer Glasplatte geschützt und in eine Fassung mit Außendimensionen von 120 mm x 120 mm montiert.

ventilen zum Einsatz kommen. Vorher wurde die Homogenität der OD über die Filmfläche bestimmt. Bei der holographischen Aufzeichnung spielt die Variation des Brechungsindex eine größere Rolle als absorptive Änderungen, weil die Änderungen des Brechungsindex die Beugungseffizienz stark beeinflussen [104]. Für ein photochromes Material wie BR werden die Änderungen der Absorptionseigenschaften von einer Änderung des Brechungsindex begleitet. Die spektrale Abhängigkeit beider Parameter wird durch die Kramers-Kronig Relation beschrieben, die auch für BR Gültigkeit besitzt [105]. Aus diesem Grund ist es ausreichend die Homogenität des Filmes zu messen und in erster Näherung anzunehmen, daß damit auch die lichtinduzierte Brechungsindexänderung räumlich konstant ist.

Zur Bestimmung der Homogenität über die Fläche wurde eine lichtemittierende Diode (LED) mit einem Emissionsmaximum von 528 nm verwendet. Der parallele Strahl einer LED mit einem Durchmesser von 2 mm und einer Intensität von 10 nW/mm^2 wurde über den inneren Part des BR-Films (70 mm x 70mm) bewegt. Die transmittierte Intensität wurde alle 3 mm bestimmt. Aufgrund der geringen Testlicht-Intensität kann eine photochemische Anregung der Probe ausgeschlossen werden. In **Abb. 35** ist die Variation der OD für den gezeigten BR-Film dargestellt. In (A) ist die Schwankung der OD über die Filmfläche dargestellt. Der Mittelwert der OD beträgt $OD_{528}=1,38$ was einer OD von $OD_{570}=1,92$ entspricht. In (B) ist das Histogramm der Verteilung der OD über die Fläche zu sehen. Die Verteilung kann als Gauss-förmig angesehen werden. Die Standard Abweichung beträgt $\pm 1.9 \%$.

Ein Beispiel für die Anwendung eines auf BR-basierendes Systems zur zerstörungsfreien Materialprüfung ist die Untersuchung keramischer Motorventile aus Siliziumnitrid (Si_3N_4) unter mechanischer Belastung. Ein Aufbau mit dem eine kontrollierte Belastung der Ventilschäfte mit einer Kraft von bis zu 3000 N möglich ist, ist in **Abb. 36** dargestellt.

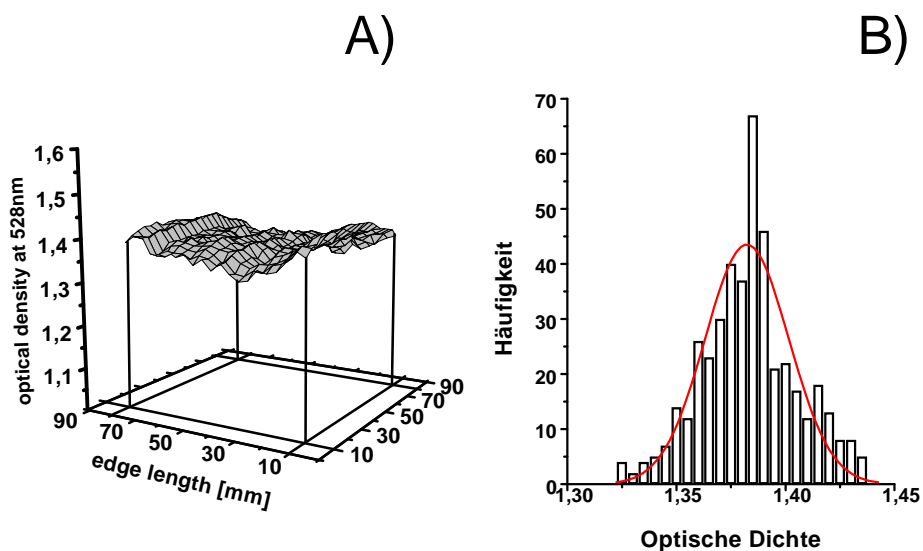


Abb. 35: Variation der OD eines BR-Films. (A) Optische Dichte eines BR-Films gemessen bei 528 nm mit eine Größe des Meßflecks von 2 mm und einer örtlichen Auflösung von 3 mm. (B) Histogramm der Optischen Dichten aus (A). Die Daten folgen einer Gauss-Verteilung mit einer Standard Abweichung von 1,9 % und einem Mittelwert der $OD(528 \text{ nm})=1,38$. Dies entspricht einem Wert von $OD(570 \text{ nm})=1,92$.

Das Ventil ist in einer massiven Halterung montiert. Die Kraft auf den Schaft wird von einem V-förmigen Kolben ausgeübt und mit einer Kraftmessdose bestimmt, die Biegung des Ventils kann dann interferometrisch verfolgt werden. Die Schwierigkeit der interferometrischen Analyse des dunkelgrauen keramische Materials besteht in der runden Form des Werkstücks und der Kombination aus diffuser Reflektion und Spiegelung an der polierten Oberfläche des Materials. Die Intensität des vom Ventil gestreuten Lichts beträgt typischerweise $50 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ in der Objektebene. Die Intensität des Referenzstrahls beträgt $3 \text{mW}/\text{cm}^2$. Daraus ergibt sich eine effektive Intensität von ca. $150 \mu\text{W}/\text{cm}^2$.

Zu Beginn der Interferometrischen Analyse wird eine definierte Kraft auf den Ventilschaft ausgeübt. Dann wird das erste Hologramm, das sogenannte Referenz-Hologramm, mit einer Belichtungszeit von 3 s aufgenommen. Danach wird das Ventil mit einer zusätzlichen Kraft belastet und ein zweites Hologramm wird mit der gleichen Belichtungszeit aufgenommen. Um das Interferogram zu rekonstruieren, wird der Objektstrahl ausgeschaltet. Der Referenzstrahl rekonstruiert nun gleichzeitig die beiden eingeschriebenen Hologramme, die miteinander interferieren und das Interferenzstreifenmuster liefern. In **Abb. 37** ist ein solches Interferenzstreifenmuster zu sehen. Es zeigt eine annähernd gleichförmige Auslenkung des Ventilschafts. Die maximale Auslenkung in der Mitte des Ventils beträgt $8,2 \mu\text{m}$. Die leichte Verkipfung der Streifen in der Nähe des Belastungskolbens zeigt, daß eine Verwindung an, die sich in einer horizontalen Auslenkung des Ventils von $0,3 \mu\text{m}$ äußert.



Abb. 36: Aufbau zur Deformation von Keramikventilen. Mit diesem Aufbau kann eine kontrollierte Kraft auf den Schaft eines Keramikventils erzeugt werden. Er wird in der Objektebene eines Interferometrieaufbaus plaziert.

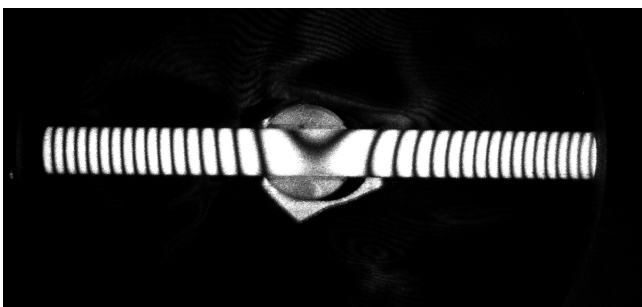


Abb. 37: Interferogramm eines Keramik-Ventils. Das Interferogramm wurde in Doppelbelichtungstechnik aufgenommen. Nach einer Anfangsbelastung von 500 N wurde das Ventil mit zusätzlichen 40 N belastet.

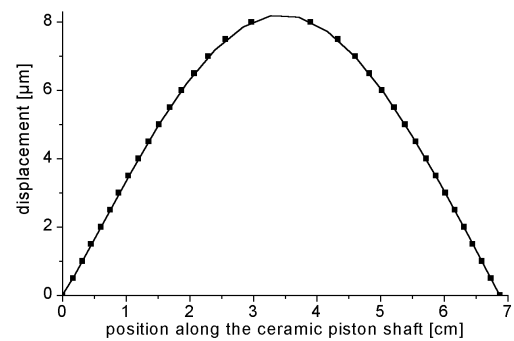


Abb. 38: Verbiegung eines keramischen Motorventils. Die Kurve wurde von dem in Abb. 37 gezeigten Interferenzmuster berechnet. Die maximale Auslenkung beträgt 8 μm .

6.3.3 Bakteriorhodopsin-Filme mit erhöhter Lichtempfindlichkeit

Die Verwendung von BR-Filmen mit optimierter Lichtempfindlichkeit sollte in dem zuvor beschriebenen Interferometriensystem demonstriert werden. Dazu wurde der Vergleich zwischen zwei identischen BR-D96N-Filmen ($\text{pH} = 10,5$), die sich nur im Wassergehalt unterscheiden angestellt. Wie in Kap. 6.3.2 beschrieben, wurde die Verbiegung eines keramischen Motorventils untersucht. In **Abb. 36** sind die erhaltenen Ergebnisse dargestellt. Im oberen Teil sind die erhaltenen Interferogramme zu sehen. Der Vergleich verdeutlicht, daß die Intensität des rekonstruierten Signals im Falle des Films mit hohem Wassergehalt ($\text{rLF} = 90\%$) wesentlich größer ist. Um eine Sättigung des Detektors zu vermeiden mußte, in diesem Fall die Shutterzeit der CCD-Kamera um den Faktor 3 reduziert werden. In der unteren Abbildung sind die Linienprofile der Interferogramme dargestellt. Mit ihnen lassen sich die Intensitäten der Interferogramme in erster Näherung gut abschätzen. Dabei zeigt sich, daß das Signal des Films mit hohem Wassergehalt um den Faktor 10-20 größer ist. In Kombination mit der reduzierten Shutterzeit

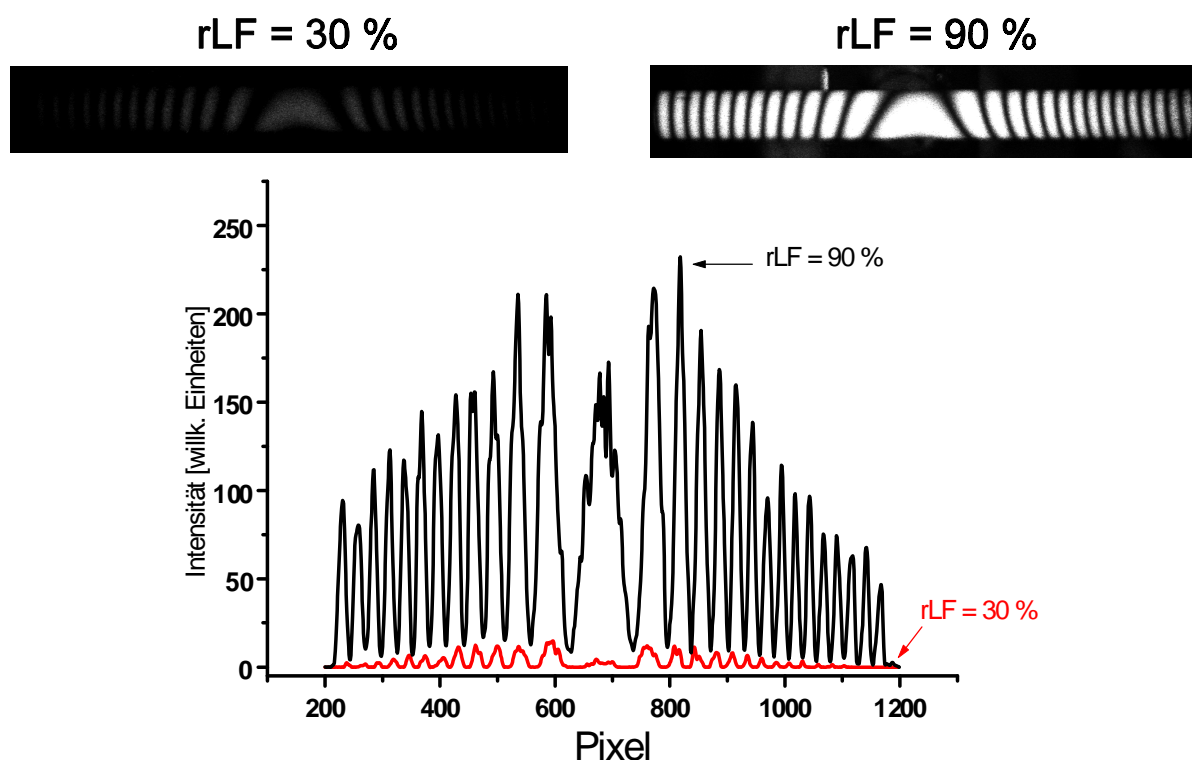


Abb. 36: Interferogramme eines belasteten keramischen Motorventils. Mit zwei BR-Filmen (BR-D96N, $\text{pH} = 10,5$) deren Lichtempfindlichkeit durch unterschiedliche Wassergehalte eingestellt wurde ($\text{rLF} = 90\%$ und $\text{rLF} = 30\%$) wurde die Belastung eines keramischen Motorventils aufgenommen. Im oberen Teil sind die erhaltenen Interferogramme zu sehen. Im unteren Teil ist das Linienprofil des Streifenmusters zu sehen. Die Shutter-Zeit der CCD-Kamera mußte im Falle des 90 % -Films um den Faktor drei verkleinert werden, um eine Sättigung zu vermeiden.

ergibt sich also eine Intensitätssteigerung des Signals um den Faktor 30-60. Durch die gezielte Einstellung des Wassergehaltes konnte somit eine Steigerung der Lichtempfindlichkeit des Materials um mindestens eine Größenordnung erzielt werden.

6.4 Zusammenfassung

Es sollte der Einsatz von Bakteriorhodopsin-Filmen in der zerstörungsfreien Materialprüfung mittels Holographischer Interferometrie demonstriert werden. Dabei wurden zwei Themenkomplexe bearbeitet. Zum einen sollte der Einsatz bzw. der Vorteil von großflächigen BR-Filmen, zum anderen die Photochemische Optimierung der Filme aufgezeigt werden.

Der Einsatz von großflächigen Filmen wurde mit der Untersuchung keramischer Motorventile demonstriert. Durch die Herstellung eines Films mit einer freien Apertur von 90 mm x 90 mm konnte ein Aufbau realisiert werden, der in der Objektebene auf optische Komponenten wie Linsen verzichtet. Der Verzicht auf diese optischen Bauteile, die sonst die Auflösung des Systems limitieren, ermöglicht es, die volle Auflösung von BR (5000 Linien/mm) auszunutzen. Die Schwankung der optischen Dichte des Filmes wurde mit $\pm 1,39\%$ bestimmt. Ein Einsatz dieses Filmes in der zerstörungsfreien Materialprüfung war ohne erkennbare Verluste möglich. Desweiteren wurde die Lichtempfindlichkeit der BR-Filme untersucht und für die Bedürfnisse der holographischen Anwendung optimiert. Die Untersuchung der Lichtempfindlichkeit zeigte, daß die Mutante D96N dem WT überlegen ist. Der Austausch des internen Protonendonators kann nicht durch physikalisch-chemische Modifikationsmöglichkeiten kompensiert werden. Grund dafür ist, daß eine Reduzierung des Wassergehalts der Probe zwar zu einer Verlängerung der M-Lebensdauer führt, auf der anderen Seite aber auch die photochemische Reaktion von B nach M beeinflußt. Durch den reduzierten Wassergehalt wird sie behindert.

Durch den Einsatz optimierter BR-Filme konnte die Intensität des abgelenkten Strahls erhöht werden. Nach vorsichtigen Abschätzungen konnte die Intensität mindestens um den Faktor 30-60 gesteigert werden. Diese Verbesserung führt dazu, daß im Rahmen der zerstörungsfreien Materialprüfung Laser mit niedrigeren Ausgangsleistungen verwendet werden können, oder aber daß die Größe der zu untersuchenden Objekte vergrößert werden kann.

Die Optimierung der photochemischen Eigenschaften führt letztlich dazu, daß das auf BR basierende System zur zerstörungsfreien Materialprüfung auch unter wirtschaftlichen Gesichtspunkten optimiert wurde bzw. daß die Möglichkeiten des Einsatzes erweitert werden konnten.

7 EINSATZ VON BAKTERIORHODOPSIN IN DER SICHERHEITSTECHNIK

7.1 Einleitung

Nachdem in den vorangegangenen Kapiteln hauptsächlich die photochemischen Eigenschaften von BR untersucht und für eine bereits bekannte Anwendung (Holographische Interferometrie) optimiert wurden, soll im folgenden Kapitel eine neue Anwendungsmöglichkeit von Bakteriorhodopsin aufgezeigt werden. Die Verwendung von Bakteriorhodopsin als photochromes Material in der Sicherheitstechnik soll demonstriert werden.

In den letzten Jahren haben Produktfälschungen und Fälschungen im allgemeinen epidemische Ausmaße angenommen. Daraus entsteht der Industrie und dem Handel ein erheblicher Verlust in Form von Gewinnen. In einigen Studien wird der Anstieg der Fälschungen auf über 1000% in den letzten 5 Jahren geschätzt. Die US International Trade Commission beziffert den Schaden, den Produkt Piraterie der US-Wirtschaft verursacht, auf 43-61 Milliarden Dollar pro Jahr [106]. Diese Zahlen verdeutlichen, daß Schutzmechanismen gegen unerlaubte Vervielfältigung und/oder Produkt-Piraterie von entscheidender Bedeutung für die Wirtschaft und den Staat sind [107].

Unter einem Schutzmechanismus versteht man ein Identifizierungsmerkmal, das die Vervielfältigung im Idealfall unmöglich macht, mindestens jedoch deutlich erschwert. Ein möglicher Schutzmechanismus ist z.B. die Verwendung von Hologrammen; diese werden auf Kredit- und ec-Karten seit längerem eingesetzt [108].

Die Reproduktion eines mit einem solchen Hologramm versehenen Gegenstands wird erschwert, da alle herkömmlichen Kopierverfahren die Eigenschaften des Hologramms nicht reproduzieren können. Das Haupthindernis eine dem Original vergleichbare Kopie zu erstellen, liegt dann in der „Beschaffung“, bzw. Herstellung des „echten“ Identifizierungsmerkmals.

Der Nutzen photochromer Materialien für sicherheitstechnische Anwendungen ist schon seit längerem bekannt [109]. Photochrome Materialien sind Farbstoffe, die bei Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlänge ihre Farbe im Idealfall reversibel verändern [110][111]. Bei der Verwendung synthetischer Photochrome wird das Identifizierungsmerkmal in den meisten Fällen durch UV-Licht sichtbar gemacht [112]. Ohne UV-Licht ist das Identifizierungsmerkmal dann aber schlecht, bzw. gar nicht zu erkennen, so daß ein Fehlen des Sicherheitsmerkmals bei der Abwesenheit von UV-Licht vom Anwender nicht bemerkt wird. Ferner ist bei der Authentizitäts-

prüfung die Verwendung eines geeigneten Schutzes notwendig, um die Augen des Prüfers vor der UV-Strahlung zu schützen. Der Einsatz von Materialien, die zur Authentizitätsprüfung UV-Licht benötigen, muß deshalb als unvorteilhaft angesehen werden.

Die Suche bzw. Synthese eines Photochroms, das die Verwendung von UV-Licht überflüssig macht, scheint aus diesem Grund erstrebenswert. Ein potentieller Vertreter ist das Retinalprotein Bakteriorhodopsin.

In **Abb. 37** ist der prinzipielle Einsatz von Bakteriorhodopsin in der Sicherheitstechnik schematisch dargestellt. Dabei sind zwei unterschiedliche Arten von Schutzmechanismen denkbar. Im ersten Fall ist ein Dokument mit Bakteriorhodopsin markiert. Bei Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlänge ($\lambda=500-600$ nm) wechselt die Sicherheitsmarkierung die Farbe (violett nach gelb). Der Farbwechsel von gelb nach violett kann nun entweder thermisch oder

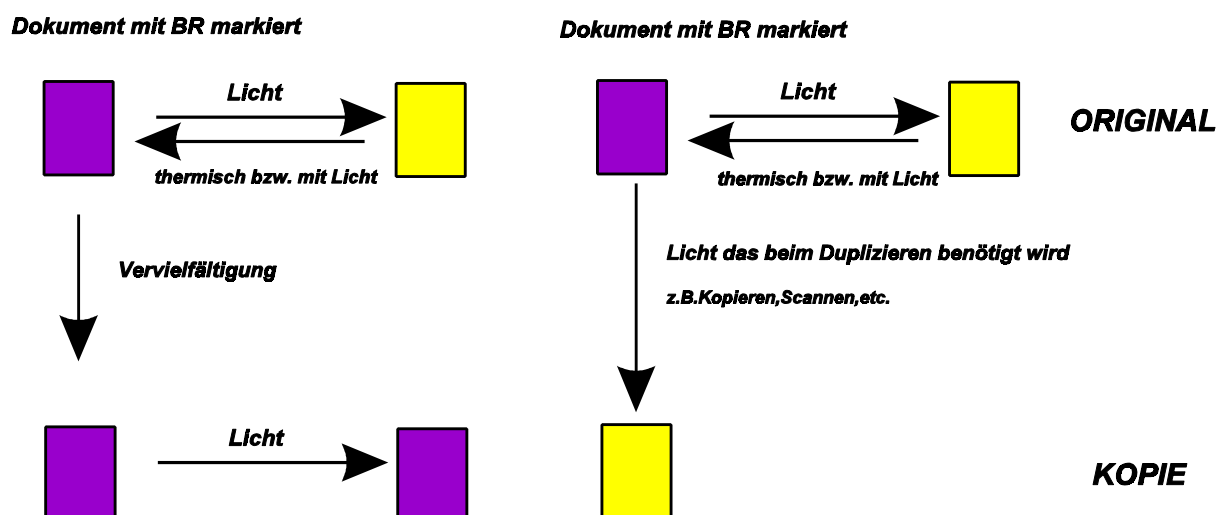


Abb. 37: Prinzipieller Einsatz von Bakteriorhodopsin in der Sicherheitstechnik. Beim Einsatz von BR in der Sicherheitstechnik soll der lichtinduzierte Farbwechsel (violett / gelb) von BR ausgenutzt werden. Zwei Arten von Schutzmechanismen sind dabei denkbar. Im ersten Fall ist BR mit einer BR enthaltenden Markierung versehen. Wird das Dokument unerlaubt vervielfältigt, dann kann die Kopie durch das Fehlen des lichtinduzierten Farbwechsels vom Original unterschieden werden. Im zweiten Fall, wird zum Duplizieren Licht verwendet, dessen Intensität ausreicht den Farbwechsel während des Kopiervorganges zu induzieren. Auch in diesem Fall ist das Original von der Kopie zu unterscheiden.

photochemisch durch die Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlängen erfolgen ($\lambda < 450$ nm). Erfolgt die Rückreaktion thermisch, so kann die dazu benötigte Zeit über die Lebensdauer des M-Intermediates eingestellt werden.

Wird das Dokument unautorisiert vervielfältigt, bleibt die Eigenschaft des Farbwechsels nur bei Verwendung von Bakteriorhodopsin erhalten. Damit wird das unautorisierte Kopieren deutlich erschwert, wenn nicht sogar unmöglich gemacht.

Im zweiten Fall wird zur Vervielfältigung Licht verwendet (Kopierer, Scanner, etc.). Die Lichtempfindlichkeit des Sicherheitsmerkmals muß so eingestellt werden, daß das zum Duplizieren benötigte Licht ausreicht, um einen Farbwechsel von violett nach gelb während des Kopiervorgangs zu induzieren. Auch in diesem Fall unterscheiden sich Original und Kopie voneinander.

Neben der Verwendung von UV-Licht weisen herkömmliche organische photochrome Materialien noch einen weiteren Nachteil auf. Die Schaltzyklenzahl wird mit 10^4 - 10^5 angegeben. Hierdurch ist die Zahl der möglichen Prüfvorgänge begrenzt. Damit ist ein Einsatz in automatisierten Testverfahren, wie z.B. in Geldautomaten oder Zugangskontrolleinrichtungen, nur begrenzt oder gar nicht möglich. Da BR mit 10^6 eine um mindestens eine Größenordnung größere Schaltzyklenzahl besitzt, ist es den organischen photochromen Materialien auch in dieser Hinsicht überlegen.

Nachdem die potentiellen Vorteile von BR aufgezeigt wurden, sollen die Anforderungen diskutiert werden, die bei einem Einsatz in der Sicherheitstechnik an das Material gestellt werden.

An erster Stelle ist der Preis und die Verfügbarkeit des Rohmaterials zu nennen. Noch vor einigen Jahren wäre ein Einsatz in der Sicherheitstechnik aus wirtschaftlichen Gründen undenkbar gewesen. Aufgrund optimierter Anzuchtbedingungen der Halobakterien und neuer Reinigungsverfahren [113], ist eine preiswertere Herstellung und damit ein Einsatz von BR in der Sicherheitstechnik nun denkbar.

Ein weitere Problem ist die Applikation des Materials. Die hohen Stückzahlen, die in der Sicherheitstechnik gefordert sind, implizieren, daß die Applikation über ein reproduzierendes Verfahren wie zum Beispiel Druckverfahren geschehen muß.

Ziel war daher die Entwicklung von Zubereitungen aus Bakteriorhodopsin (BR) und Hilfsstoffen, die als Druckfarben bzw. -Tinten verwendet werden können. Da BR-Suspensionen nicht ohne Matrixmaterialien und Hilfsstoffen verdruckt werden können, mußte die Verträglichkeit der Druckgrundlage mit PM sichergestellt sein. Weiterhin mußte überprüft werden, ob das biologische Material PM, durch die bei einer Applikation auftretenden Kräfte (z.B. Scherkräfte) irreversibel geschädigt oder ob die Funktionsweise von BR dadurch beeinträchtigt wird. Deshalb sollten mit der entwickelten Farbe Demonstrationsbeispiele erstellt werden, die belegen, daß BR mit einem herkömmlichen Druckverfahren applizierbar ist.

Weiterhin sollte damit die Funktionsweise von BR in der Sicherheitstechnik demonstriert werden („proof of principle“). Dazu ist die gezielte Einstellung der photophysikalischen Eigenschaften von BR von entscheidender Bedeutung.

7.2 Herstellung photochromer Mischungen mit Bakteriorhodopsin

7.2.1 Zielsetzung

Zur Realisierung einer druckbaren Mischung mit BR als photochromen Material wurden zwei Wege beschritten. Zum einen wurde versucht, in bestehende Systeme ohne Pigmentzusatz (Klarlack, Rasterpaste etc.), die zum Druck geeignet sind, Bakteriorhodopsin als Pigment einzumischen. Dabei sollten vor allem Erfahrungen mit Farben gesammelt werden (z.B. rheologische Eigenschaften), die für eine Druckenwendung entwickelt wurden.

Problematisch bei der Verwendung bestehender Systeme ist, daß die Inhaltsstoffe und die genaue Zusammensetzung der Systeme nicht bekannt sind und auch nicht ohne weiteres zugänglich sind (Betriebsgeheimnis). Das zentrale Problem ist demzufolge die Verträglichkeit von BR mit diesen Farben, da davon ausgegangen werden muß, daß sie Zusatzstoffe wie z.B. Tenside oder organische Verbindungen/Lösungsmittel enthalten, die den Kristallverband der PM auflösen, was den Verlust der Stabilität von BR zur Folge hat. Außerdem ist eine gezielte Einstellung des pH-Wertes dieser Farben nicht oder nur sehr schwer möglich. Die Einstellung des pH-Wertes ist von entscheidender Bedeutung, da er die photophysikalischen Eigenschaften von BR beeinflusst.

Daher sollte zum anderen versucht werden, eine druckfähige Mischung mit BR zu entwickeln. Vorteil einer solchen Farbe ist die Kenntnis der genauen Zusammensetzung. Damit können Stabilitätsprobleme ausgeschlossen bzw. umgangen werden. Zudem kann der pH-Wert der Farbe gezielt eingestellt werden.

7.2.2 Wahl des Matrixmaterials

Zur Entwicklung einer Farbe ist es notwendig, neben dem Photochrom Bakteriorhodopsin und etwaigen Hilfsstoffen ein Matrixmaterial zur Fixierung des Farbstoffes einzusetzen. Das Matrixmaterial ist von entscheidender Bedeutung, da es die rheologischen Eigenschaften des Systems und damit seine Druckbarkeit festlegt. Grundvoraussetzung bei der Wahl des Matrixmaterials ist die Verträglichkeit mit PM. Ziel war also die Suche nach einem Matrixmaterial, das mit PM verträglich ist und dessen rheologischen Eigenschaften in einem möglichst weiten Bereich variiert werden können. Da PM mit organischen Lösungsmitteln nur begrenzt verträglich ist, kommen bei der Suche nur wasserlösliche Polymere in Frage.

Bekannt ist, daß Bakteriorhodopsin in eine Vielzahl von hydrophilen Polymeren (z.B. PVAL, PAA, Gelatine) eingebettet werden kann, ohne daß die Kristallstruktur, an die die Stabilität und

damit die Funktionalität des Proteins gekoppelt ist, irreversibel zerstört wird.

Besonders vielversprechend erscheint in diesem Zusammenhang die Verwendung von Polyvinylalkoholen (PVAL). Aufgrund variierender Herstellungsbedingungen (Verseifungsgrad etc.)⁷ existieren PVAL-Typen mit unterschiedlichen Eigenschaften wie z.B. der Viskosität, die für die Applizierbarkeit der photochromen Mischungen einen entscheidenden Parameter darstellt. Anhand dieser Typenvielfalt ist es möglich, mit einem Grundmaterial die Anforderungen an das Applikationsverfahren gezielt einzustellen. Zur Herstellung der Rezepturen wurden deshalb Polyvinylalkohole (PVAL) der Firma Höchst (Mowiol®) verwendet.

7.2.3 Pigmentierung der Matrixmaterialien

Ein entscheidender Schritt zur Erzeugung eines pigmentierten Beschichtungstoffes ist die Präparation von Mischungen aus Pigment und Bindemittel. Die Anforderungen an solche Mischungen sind feinste Verteilbarkeit des Pigmentes in der Matrix (Pigmentdispergierbarkeit), homogene Verteilung (Pigmentbindevermögen), Haftung der Pigmente nach der Härtung des Systems und, gerade im Falle des Einsatzes von Purpurmembran (PM), die chemische Verträglichkeit der Komponenten.

Neben der Entwicklung einer Farbe mit PVAL als Matrixmaterial sollte auch auf bestehende Systeme ohne Pigmentzusatz zurückgegriffen werden. In beiden Fällen konnte die Pigmentierung des Bindemittels auf zwei Arten erfolgen.

Zum einen bestand die Möglichkeit, eine PM-Suspension zu verwenden, zum anderen der Einsatz gefriergetrockneter PM. Dabei zeigte sich, daß die Verwendung von gefriergetrocknetem Material Vorteile aufweist:

Die Konzentrationen der PM-Suspensionen ist aufgrund der Herstellungsbedingungen erheblichen Schwankungen (Faktor 2-3) unterworfen. Damit wird eine reproduzierbare Einstellung der PM-Konzentration in der Farbe deutlich erschwert. Außerdem ändern sich die rheologischen Eigenschaften der Mischung mit dem Pigmentierungsgrad. Damit ist die Zusatzmenge durch die gewünschten rheologischen Eigenschaften der Mischung limitiert. D.h. die OD des Druckes kann nur in sehr engen Grenzen variiert werden.

Bei der Entwicklung einer Farbe auf PVAL-Basis konnten durch den Einsatz gefriertrockneter PM niedrigviskosere PVAL-Lösungen eingesetzt werden, die wesentlich besser handhabbar als

⁷Zur Herstellung der PVAL und deren variierende Eigenschaften siehe [114]

hochviskose PVAL-Lösungen sind und den Herstellungsprozess der Mischung damit drastisch vereinfachte.

Neben der auf PVAL basierenden Farbe sollten auch vorgefertigte Systeme untersucht werden. Es wurden vier verschiedenen Farben ohne Pigmentzusatz untersucht. Bei der Auswahl der Farben wurde versucht, bevorzugt wasserbasierende Systeme zu berücksichtigen.

Von den vier getesteten Systemen war es nur mit Aquacell® 099 möglich, eine druckbare Mischung zu erhalten. In den anderen Fällen war es nicht möglich das Pigment homogen zu verteilen (Ruco 995UV0019), so daß der resultierende Druck mit dem Auge sichtbare Inhomogenitäten (verursacht durch PM Aggregate) aufwies, oder die Verträglichkeit mit PM war nicht gegeben (MAPL, MPBM), so daß das BR irreversibel zerstört wurde.

Da die genaue Zusammensetzung der Farben nicht bekannt ist, ist der Einsatz vorgefertigter Systeme durch die Verträglichkeit mit PM limitiert.

Neben den Problemen der Verträglichkeit und der Pigmentdispergierbarkeit sollten auch in diesem Stadium wirtschaftliche Aspekte bei der Farbenherstellung berücksichtigt werden. Aus diesem Grund wurde neben vollständig gereinigten BR-Suspensionen auch „BR-crude“ verwendet. Es ist nicht vollständig gereinigt (mit Proteinen verunreinigt), damit unter wirtschaftlichen Gesichtspunkten aber wesentlich attraktiver als vollständig gereinigte BR-Suspensionen. „BR-crude“ ließ sich, genau wie gereinigtes BR problemlos gefrierdörren. Ein Einsatz dieses gefrierdörrenen Materials war bei der Herstellung von Druckfarben auf BR-Basis problemlos möglich, d.h. die Verunreinigungen machten sich in keinem Fall störend bemerkbar.

7.3 Farbrezepturen für verschiedene Applikationsverfahren

7.3.1 Siebdruck

Neben Hoch-, Tief- und Flachdruck gehört Siebdruck zu den vier grundlegenden Druckverfahren. Dabei handelt es sich im Gegensatz zu den anderen Verfahren um eine Durchdrucktechnik, d.h. die Farbe wird durch die Druckform auf das Substrat übertragen. Die Druckform besteht aus einem Siebgewebe, wobei ein Teil des Gewebes mit einer farbundurchlässigen Sperrschicht versehen ist, während der andere Teil offen bleibt, d.h. das Motiv wird durch den Wechsel von offenen und gesperrten Bereichen erhalten. Beim Druckvorgang werden die offenen Bereiche im ersten Schritt mit der Siebdruckfarbe gefüllt, im zweiten Schritt wird die Farbe auf das Substrat übertragen.

Neben der Anwendung im graphischen Bereich wird der Siebdruck auch in der Elektronik zur Herstellung von Leiterplatten eingesetzt. Die Grundformen des Siebdruckes sind relativ leicht zu lernen und die Bedienung der Geräte ist verglichen mit anderen Drucktechniken als einfach zu bezeichnen. Deshalb bietet sich diese Technik zur Durchführung dieser Machbarkeitsstudie (Einsatz von BR in der Sicherheitstechnik) an.

Zur Durchführung der Applikationsstudien wurde ein Siebdruckhalbautomat (Typ S-30, Fleischle, Brackenheim) verwendet. Die eingesetzten Siebe bestanden aus Aluminiumrahmen und Polyestergewebe. Die Kopierschicht (Fa. Koenen, München) zur Erzeugung eines gewünschten Motives wurde in 100 µm Stärke aufgebracht.

Neben zu optimierenden Maschinenparametern wie z.B. Andruck der Druckrakel und Winkel der Flutrakel spielen die Eigenschaften des Siebes (Gewebeart, Maschenweite, Fadendurchmesser, theoretisches Farbvolumen) und die Eigenschaften der Farbe eine entscheidende Rolle zur Erzeugung eines Drucks.

Zur Herstellung einer Druckfarbe mit BR als photochromer Komponente wurden zwei Wege beschritten. Zum einen wurde ein System mit PVAL als Bindemittel entwickelt, zum anderen wurde das Chromophor in bestehende Systeme ohne Pigmentzusatz eingebracht.

Im ersten Fall war eine theoretische Unterteilung des Druckverlaufs und die Einstellung der gewünschten rheologischen Eigenschaften notwendig. Da das bestehende System für die Druckanwendung optimiert war mußte in diesem Fall nur sichergestellt werden, daß die Pigmentierung mit BR die rheologischen Eigenschaften nicht nachteilig beeinflusst.

Weiterhin mußte das Druckverfahren für beide Systeme im Hinblick auf Schaumbildung und sauberen Oberflächenverlauf optimiert werden.

7.3.1.1 Anforderungen an das Fließverhalten

Die Anforderungen an das Fließverhalten mußten nur für die auf PVAL basierende Farbe untersucht werden, da das Fließverhalten der vorgefertigten Farben ohne Pigmentzusatz bereits auf die Siebdruckanwendung optimiert war.

Im folgenden wird das Verfahren des Siebdrucks in die einzelnen Prozeßschritte unterteilt und die rheologischen Anforderungen an die Siebdruckfarbe werden diskutiert. Diese Analyse und die daraus abgeleiteten Anforderungen an die Farbe sind essentiell zur Entwicklung einer druckbaren Mischung auf PVAL/PM-Basis.

Im ersten Schritt wird die Farbe mit Hilfe der Flutrakel homogen auf dem Sieb verteilt. Ziel ist es die offenen Stellen im Sieb mit Farbe zu füllen. Dabei übt die Flutrakel keinen Druck auf das Sieb aus. Gleichzeitig darf die Farbe das Gewebe nicht durchdringen, d.h. ein Fließen nach der Verteilung auf dem Sieb darf nicht stattfinden. Für die Fließeigenschaften des Systems bedeutet dies eine möglichst hohe Viskosität bei Scherraten von 10^{-2} - 10 s⁻¹, was dem Verlauf unter Schwerkraft entspricht und einer mittleren bis hohen Viskosität beim Verteilen (10^2 bis 10^4 s⁻¹). Im zweiten Schritt preßt die Druckrakel die Farbe durch das Gewebe auf das Substrat. Der Anpreßdruck, der in einem gewissen Rahmen variiert werden kann, muß die Farbviskosität deutlich erniedrigen. Dadurch kann die Farbe durch das Sieb fließen und im Idealfall vollständig herausgelöst werden.

Der dritte Schritt beschreibt den Oberflächenverlauf der Farbe auf dem Substrat. Gefordert ist eine möglichst glatte Oberfläche, d.h. die Gewebestruktur darf im Druck nicht zu erkennen sein. Idealerweise kehrt die Viskosität nach der Belastung zeitverzögert zu ihrem Ausgangswert zurück. D.h. thixotropes Verhalten der Farbe ist in diesem Prozeßschritt erwünscht, jedoch nicht zwingend erforderlich.

Anhand dieser Analyse kann abgeleitet werden, daß Newtonsches Fließen einer Probe für die Siebdruckapplikation völlig ungeeignet ist. Der einfachsten Fall, in dem Druckbarkeit gewährleistet ist, ist eine Farbe mit Strukturviskosität ohne ausgeprägte Thixotropie.

Durch genaue Abstimmung von Bindemittel- und Pigmentanteil war es möglich, das belastungsabhängige Fließen einer Siebdruckfarbe im meßtechnisch erfaßbaren Bereich mit PVAL/PM/Wasser-Systemen anzunähern. Zur Verdeutlichung ist in **Fig. 38** das dynamische Viskositätsdiagramm einer Siebdruckfarbe und einer auf PVAL/PM basierenden Mischung graphisch dargestellt. Die Aufnahme der Daten erfolgte im sogenannten CSR-Modus (Controlled Shear Rate= Schergeschwindigkeitsvorgabe), d.h. die Schergeschwindigkeit wird vorgegeben

und das Drehmoment gemessen. Darüber kann die aufgebrachte Kraft, die Schubspannung und über das Newton-Gesetz die dynamische Viskosität ermittelt werden.

Die Änderung der dynamischen Viskosität in Abhängigkeit der Scherrate war für beide Systeme nahezu identisch. In der Praxis konnten beide Farben im Siebdruck erfolgreich eingesetzt werden, d.h. sowohl das Füllen des Siebs als auch das Herauslösen der Farbe stellte bei beiden Systemen kein Problem dar.

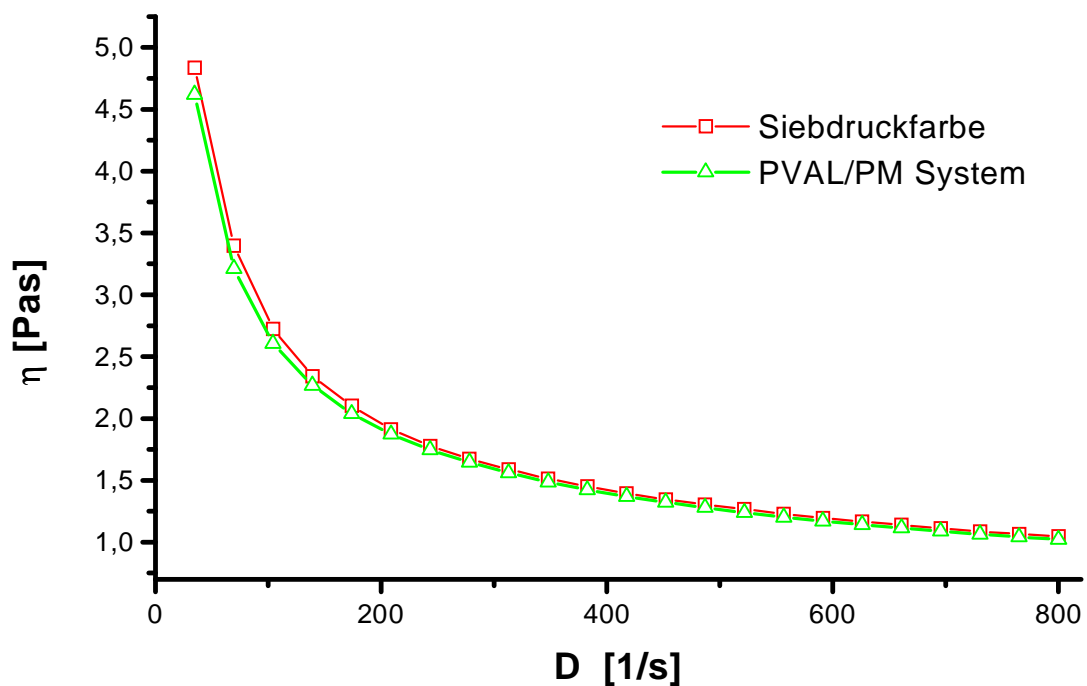


Abb. 38 Viskositätsdiagramm von Siebdruckfarbe und einer PVAL/PM-Mischung. Die aufgenommenen Daten wurden mit einem Rotationsviskosimeter im CSR-Modus erhalten. Die dynamische Viskosität ist in Abhängigkeit von der Scherrate (D) aufgetragen. Die beiden untersuchten Systeme zeigen nahezu identisches Verhalten.

7.3.1.2 Schaumbildung

Ein weiteres Problem beim Drucken stellte die Erzeugung von Luftblasen bzw. Schaumbildung dar. Diese äußert sich in stehenden Luftblasen auf dem Druck bzw. in einem glänzenden Druck. In diesem Fall ist die Oberfläche mit feinsten Blasen bedeckt. Die Schaumbildung kann zum einen durch physikalische Druckparameter und zum anderen durch die Verwendung von Zusatzstoffen und/oder die Wahl des Matrixmaterials verringert werden.

Selbst bei optimaler Einstellung der Maschinenparameter konnte die Schaumbildung bei druckbaren Mischungen, die BR als Photochrom enthalten, nicht vollständig unterdrückt werden. Eine Möglichkeit die Schaumbildung bei PVAL/PM Mischungen zu verringern, ist die Verwendung von PVAL mit hohen Hydrolisations- und Polymerisationsgraden. Durch deren Einsatz ließ sich die Schaumbildung auch nicht vollständig unterdrücken, d.h. ein Siebdruck mit PVAL-Lösungen ohne zusätzliche Entschäumerzugabe⁸ war in keinem Fall möglich.

Ziel war es daher, einen mit BR verträglicher Entschäumer zu finden. Problematisch ist in diesem Zusammenhang, daß oberflächenaktive Substanzen den Kristallverbund der PM zerstören. Deshalb mußte neben der Schaumunterdrückung auch die Verträglichkeit mit PM berücksichtigt werden.

Dazu wurden in einem Screeningverfahren verschiedene Entschäumer untersucht. Neben höheren Alkoholen, wie z.B. 1-Butanol, 1-Hexanol, 1-Octanol, wurden auch kommerziell erhältliche Entschäumer (Antifoam A (SIGMA), Agitan[®] 290 (Münzig-Chemie)) getestet. Nach Beurteilung der Wirksamkeit in Abhängigkeit der Konzentration des Entschäumers unter Berücksichtigung der Verträglichkeit mit PM und der Transparenz der erhaltenen Drucke war 1-Octanol im Falle der PVAL-Farben die beste Wahl.

PVAL-Mischungen konnten durch den Zusatz von Octanol (1% (V/V)) schaumfrei verdruckt werden. Problematisch war bei der Verwendung von 1-Octanol die eingeschränkte Haftung auf nichtsaugenden Untergründen.

Bei den vorgefertigten Systemen ohne Pigmente konnte wie bereits beschrieben nur Aquacell[®] 099 eingesetzt werden. Die Entschäumung gestaltete sich in diesem Fall sehr einfach. Es konnte

⁸ Bezeichnung für Substanzen, die an der Grenzfläche flüssig-gasf. einen geschlossenen Film bilden und dadurch dem zu entgasenden Medium ermöglichen, in sehr kurzer Zeit unter Zerstörung der Gasbläschen die kleinste Oberfläche und damit den energieärmsten Zustand ausbilden. Aus CD Römpp Chemie Lexikon- Version 1.0, Stuttgart/New York: Georg Thieme Verlag 1995

auf den auf die Farbe abgestimmten Entschäumer (L36459, Pröll) zurückgegriffen werden. Die Zugabemenge war auch in diesem Fall durch die Verträglichkeit mit PM limitiert. Trotz dieser Einschränkung konnte eine PM/Aquacell-Mischung schaumfrei verdruckt werden.

7.3.1.3 Oberflächenverlauf

Nachdem das Problem der Schaumbildung gelöst werden konnte, sollte der saubere Oberflächenverlauf der Drucke optimiert werden.

Zur Beurteilung des Oberflächenverlaufs wurden getrocknete Drucke visuell unter dem Lichtmikroskop untersucht. Dabei sollte überprüft werden, ob die Oberfläche Störungen aufweist. Neben dem Auffinden feiner Luftblasen im Druckbild ging es vor allem darum, den glatten Verlauf der Systeme zu belegen.

Versuche mit einer herkömmlichen Siebdruckfarbe machten deutlich, daß Maschinenparameter und Gewebewahl den Oberflächenverlauf entscheidend beeinflussen. Die besten Ergebnisse, d.h. eine optisch glatt erscheinende Oberflächen, wurden bei dieser Farbe mit dem Gewebe 120T erzielt.

Auch beim Einsatz der PVAL/PM-Mischungen waren feine Gewebe für saubere Drucke erforderlich. Problematisch ist dabei die verminderte Farbstärke des Drucke. Sie wird beim Transparentdruck über die Schichtdicke, die vom verwendeten Gewebe abhängig ist, reguliert. Zur Erhöhung der OD des Drucks kann ein Gewebe mit einer größeren Fadenstärke verwendet werden. Als Kompromiß zwischen hoher optischer Dichte und ebener Oberfläche wurde das Gewebe 81T verwendet, mit dem auch feine Konturen unter 100 µm Strichstärke noch darstellbar waren.

Neben den äußeren Vorgaben (Maschinenparameter, Gewebewahl) kann der Oberflächenverlauf durch die Systemeigenschaften Viskosität und Thixotropie eingestellt werden.

PVAL/PM-Systeme besitzen, verglichen mit einer Referenzfarbe (herkömmliche Siebdruckfarbe), keine ausgeprägte Thixotropie. In der Praxis bedeutet dies, daß nach Belastungswegfall die Viskosität zu schnell ansteigt und die Probe nicht ausreichend verläuft. Im schlimmsten Fall löst sich die Farbe sogar nicht vollständig aus dem Sieb.

Zur Umgehung diese Problems muß Viskosität bei niedrigen Scherbelastungen verringert werden. Meßtechnisch spiegelt sich dieser Sachverhalt in einer verringerten Fließgrenze des Systems wider. Verglichen mit der herkömmlichen Siebdruckfarbe (10 Pa), die thixotrop ist, ist die Fließgrenze einer Mischung auf PVAL-Basis (5-6 Pa), mit der ein guter Oberflächenverlauf

erreicht wird, um den Faktor 2 kleiner.

Auch PM/Aquacell® Mischungen konnten gut verdruckt werden. Ein Nachteil dieser Mischung ist jedoch, daß aufgrund der Zusammensetzung der Grundfarbe, keine transparenten Drucke erstellt werden können.

Als Druckträger eignen sich für beide Systeme feine Papiere (wie z.B.S041061, photo-quality, Epson), das die Konturen der Motive gut wiedergibt.

In **Abb. 39** und **Abb. 40** sind die Untersuchungen der Oberflächen im Lichtmikroskop von zwei unterschiedlichen Drucken dargestellt. Der Druck erfolgte mit einem 120T-Gewebe, als Substrat wurde HP-Glossy Ink-Jet Papier (HPC3837A, Hewlett Packard) verwendet.

Bei der Aufnahme der mit Aquacell®/PM (**Abb. 39**) gedruckten Fläche sind deutlich Abdrücke des Siebgewebes sichtbar. Bei PVAL/PM (**Abb. 40**) dagegen ist kein Siebabdruck sichtbar. Die Oberfläche ist jedoch mit feinen Kratern und einzelnen kleinen Luftblasen versehen. Diese Inhomogenitäten des Druckbildes sind auf das stark saugende Substrat zurückzuführen. Auf nichtsaugender Folie wurden keine Krater oder Siebabdrücke gefunden.

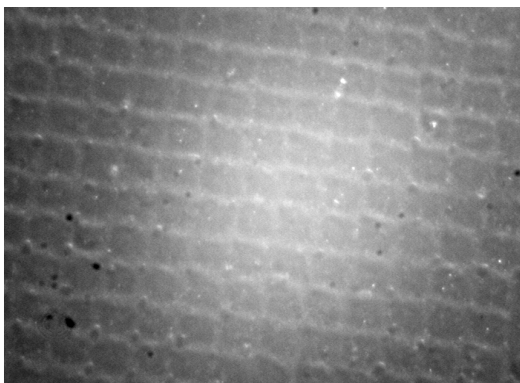


Abb. 39 Aquacell® / PM auf HPC3837A

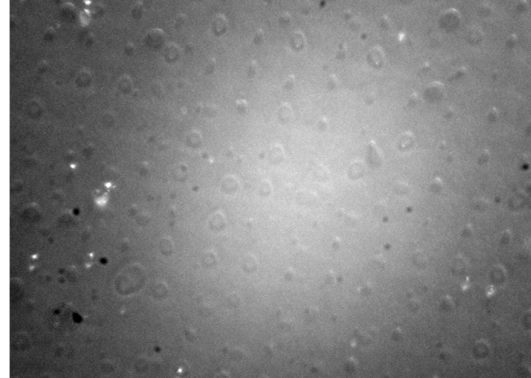


Abb. 40: PVAL / PM auf HPC3837A

7.3.2 Offsetdruck

Beim Offsetdruck handelt es sich um ein Flachdruckverfahren, d.h. zu bedruckende und nicht zu bedruckende Stellen liegen nahezu in einer Ebene. Das Verfahren beruht auf dem physikalisch- chemischen Verhalten bestimmter Substanzen, die farbannehmend und farbabstoßend sind. Eine detaillierte Beschreibung des Verfahrens ist in [50] zu finden.

Der Offsetdruck ist das dominierende Druckverfahren der Gegenwart. Im Gegensatz zum Siebdruck, das hauptsächlich im graphischen Bereich angewendet wird, können mit dem Offset-Verfahren hohe Stückzahlen gedruckt werden. Alle auflagenstarken Druckerzeugnisse wie z.B. Tageszeitungen werden deshalb im Offset-Verfahren gedruckt.

Ziel war es, Bakteriorhodopsin mit der Technik des Offsetdruckes zu applizieren. Damit sollte gezeigt werden, daß das biologische Material mit einem hoch reproduzierbaren Verfahren zu verdrucken ist.

Dazu wurde auf bestehende Druckfarben ohne Pigmentzusatz der Fa. Gebr. Schmidt in Frankfurt zurückgegriffen. Unter den sieben getesteten Systemen erwies sich die UV-härtende Farbe 1UF01 als besonders vielversprechend.

Da die Farbe nicht wassermischbar war, konnte Bakteriorhodopsin nicht als Suspension, sondern nur trocken zugesetzt werden. Verwendet wurden 1 g Bakteriorhodopsin D96N crude für 5 mL Farbe. Die Verteilung erfolgte durch mehrstündiges Einrühren und anschließendes Abstehen über

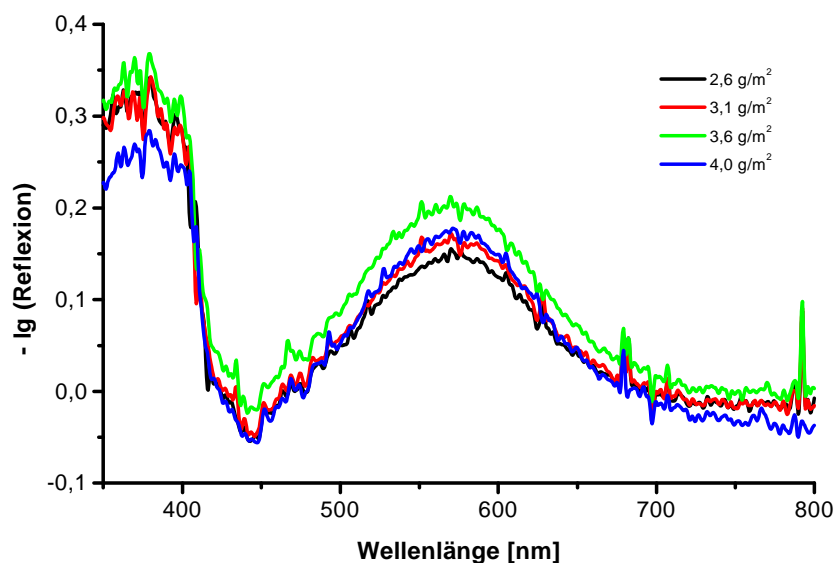


Abb. 41 Offsetdruck von Bakteriorhodopsin. Reflexionsspektren von Bakteriorhodopsin-D96N-crude in der 1UF01 Druckfarbenmatrix der Fa. Gebr. Schmidt auf Kunstdruckpapier in Abhängigkeit von der Wellenlänge.

Nacht zur Entfernung der Luftblasen. Die Farbe wurde dann bei der Firma Gebr. Schmidt mittels Offsetdruck auf zwei unterschiedliche Substrate (Kunstdruckfolie, PE-Folie) aufgebracht.

In **Abb. 41** und **Abb. 42** sind die Ergebnisse der Reflexionsspektroskopie für die erhaltenen Proben in Abhängigkeit von der Wellenlänge gezeigt. Dazu wurde ein Laboraufbau unter Verwendung einer Integrationskugel (Ulbricht-Kugel), einer Xe-Hochdrucklampe und eines Gitterspektrographen verwendet (alle Komponenten stammen von der Fa. Oriol, Darmstadt).

Beide Diagramme verdeutlichen, daß es sich bei der absorbierenden Spezies um Bakteriorhodopsin handelt.

Mit dieser Versuchsreihe konnte gezeigt werden, daß Bakteriorhodopsin mit einer herkömmlichen Offsetdruckfarbe ohne Pigment verträglich ist. Mit dieser Farbe war es möglich, im Offset Verfahren verschiedene Substrate zu bedrucken.

Da es sich bei der verwendeten Farbe um eine UV-härtende Farbe handelt, wird die außergewöhnliche Stabilität der PM gegenüber Umwelteinflüssen unterstrichen. Auch der Einsatz in einem hochreproduzierendem Druckverfahren wie dem Offsetdruck, bei dem die Farbe durch starke Scherkräfte beansprucht wird, ist für ein biologisches Material nicht selbstverständlich.

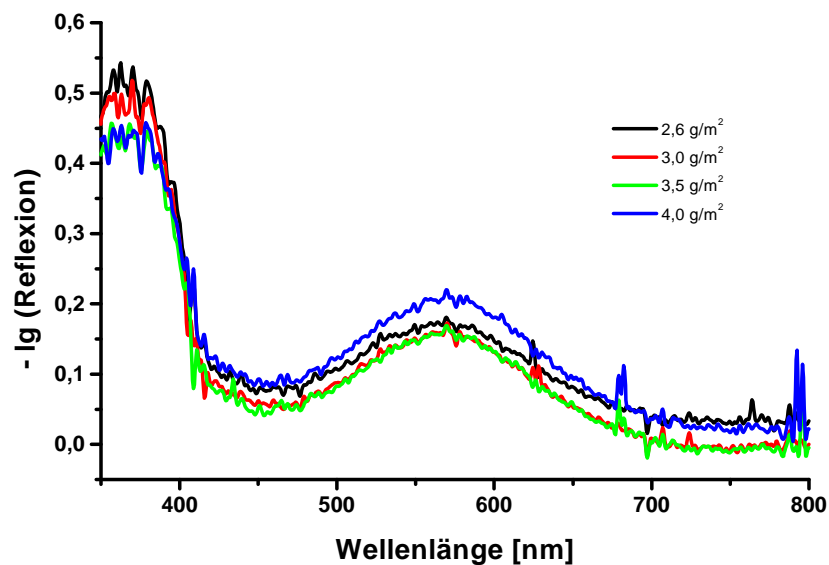


Abb. 42 Offset Druck von Bakteriorhodopsin. Reflexionsspektren von BR-D96N-crude in der 1UF01 Druckfarbenmatrix der Firma Gebr. Schmidt auf PE-Folie in Abhängigkeit von der Wellenlänge.

7.4 Demonstrationsbeispiele

Ziel war es, den prinzipiellen Einsatz von BR in der Sicherheitstechnik aufzuzeigen. Daher werden im folgenden verschiedene Demonstrationsbeispiele gezeigt. Bei diesen Beispielen handelt es sich um Dokumente, die mit einem Sicherheitsmerkmal versehen sind. Das Sicherheitsmerkmal besteht aus einer mit einer herkömmlichen Farbe (HP-Deskjet, Hewlett Packard) bedruckten Fläche und einer mit BR bedruckten Fläche, die mittels Siebdruck aufgebracht wurde. Die mit einer herkömmlichen Farbe gedruckten Fläche diente zur verbesserten Visualisierung des Farbwechsels durch die Erzeugung eines Farbkontrastes.

Zur Einstellung der M-Lebensdauer und der Lichtempfindlichkeit war die Verwendung der in Kap. 5.2 beschriebenen Hilfsstoffe notwendig.

Abb. 43 verdeutlicht den Einsatz von BR in der Sicherheitstechnik. In (A) sind zwei Dokumente zu sehen, die beide mit einer Sicherheitsmarkierung versehen sind. In dem einen Fall wurde

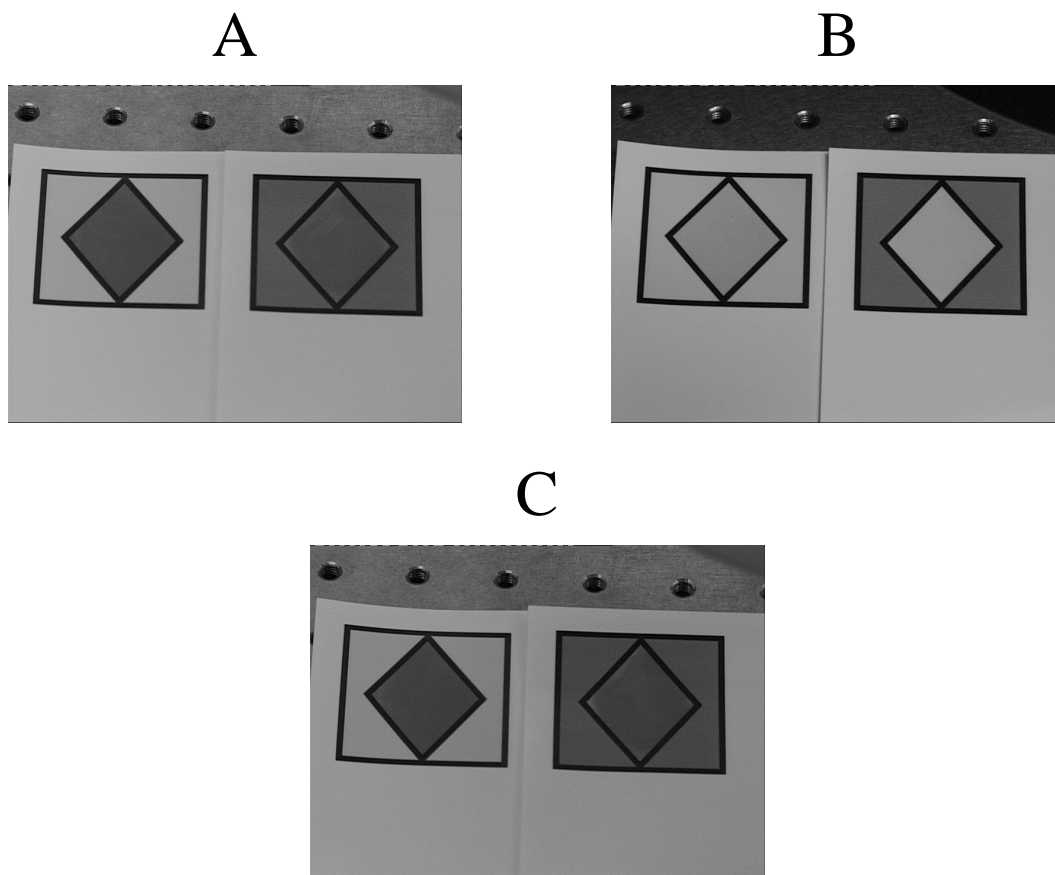


Abb. 43: Lichtinduzierte Farbwechsel von BR Mit den drei Bildern soll der prinzipielle Einsatz von BR in der Sicherheitstechnik verdeutlicht werden. In (A) ist das mit BR bedruckte Dokument vor der Belichtung, in (B) direkt nach der Belichtung mit Licht einer herkömmlichen Halogenlampe und in (C) nach der Belichtung mit blauem Licht zu sehen.

neben BR eine herkömmliche, nicht photochemisch aktive gelbe und im anderen Fall eine violette Farbe zur Erhöhung des Farbkontrastes verwendet. In (B) sind die gleichen Dokumente nach Belichtung mit einer herkömmlichen Halogenlampe (100 W) zu sehen. In dem mit BR bedruckten Bereich hat der photochemisch induzierte Farbwechsel von violett nach gelb stattgefunden. Dieser Farbwechsel wird durch die hohe M-Lebensdauer ermöglicht. Durch sie wird das Verhältnis der Konzentrationen von M und B im stationären Zustand zu Gunsten des M-Intermediates verschoben. Da das M-Intermediat im blauen Wellenlängenbereich absorbiert, wird die Komplementärfarbe Gelb sichtbar. Beim ersten Dokument nimmt der Kontrast bei Belichtung ab, beim zweiten Dokument nimmt der Kontrast bei Belichtung zu. In beiden Fällen unterscheidet sich die Markierung erheblich von der anfänglichen Markierung. In (C) sind die

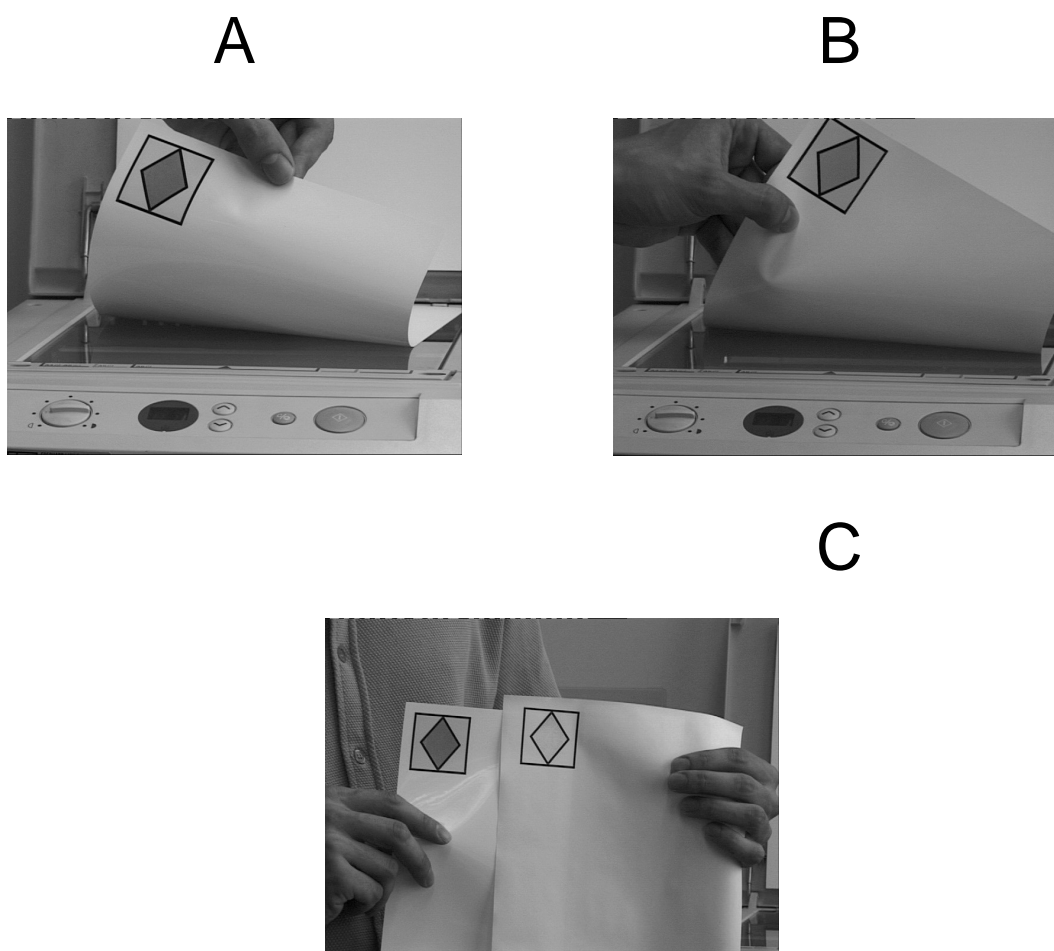


Abb. 44: Ein auf BR basierender Kopierschutz. Das gezeigte Beispiel soll die Realisierung eines auf BR basierenden Kopierschutzes demonstrieren. Ein Dokument wird mit einem Sicherheitsmerkmal versehen. Ein Teil dieses Merkmals besteht aus BR. Vor dem Kopiervorgang (A) weist das Merkmal einen erheblichen Kontrastunterschied auf. Dieser wird durch den Kopiervorgang (B) vermindert. In (C) ist das Ergebnis des Kopiervorganges zu sehen.

in (B) gezeigten Dokumente nach Bestrahlung mit Licht blauer Wellenlänge ($\lambda=413$ nm) zu sehen. Sie sind jetzt nicht mehr von den ursprünglichen Dokumenten zu unterscheiden. Man erhält das gleiche Ergebnis, wenn statt des blauen Lichts die thermische Rückreaktion von M nach B ausgenutzt wird. Die Einstellung des ursprünglichen Zustandes ist dann von der Lebensdauer des M-Intermediates abhängig. In unserem Fall war die Rückreaktion in wenigen Minuten abgeschlossen.

In **Abb. 44** ist ein Demonstrationsbeispiel gezeigt, das den Einsatz von BR als Kopierschutz verdeutlicht. Das zu schützende Dokument wird wieder mit einer BR enthaltenden Sicherheitsmarkierung versehen, die zur Erzeugung eines Farbkontrastes eine nicht photochemisch aktive Farbe enthält. Die Lichtempfindlichkeit der BR-Schicht wird so eingestellt, daß herkömmliches Tageslicht zu keiner bzw. nur zu einer nicht merklichen Bleichung führt (A). Da die Intensität des zum Kopiervorgang benötigten Lichts wesentlich höher ist, wird die BR-Schicht vollkommen bzw. nahezu vollkommen durchgebleicht. Dies wird in (B) verdeutlicht, wo das Dokument direkt nach dem Kopiervorgang zu sehen ist. In (C) ist schließlich der Vergleich des Originaldokumentes mit der Kopie zu sehen. Da es sich hier um einen s/w Kopierer handelt, ist in der Kopie lediglich der Verlust des Intensitätskontrastes zu erkennen.

Im letzten Beispiel (**Abb. 45**) soll eine weitere Variante zur Verwendung von BR in der Sicherheitstechnik gezeigt werden. Dabei wird die photochemische Rückreaktion von B nach M ausgenutzt [116]. Die Lichtempfindlichkeit der BR Schicht muß dann so eingestellt werden, daß bei normalem Tageslicht eine vollständige Bleichung erzielt wird (A). Mit Licht geeigneter Wellenlänge (hier $\lambda=413$ nm, eingekoppelt in eine Lichtleitfaser) (C) kann die photochemische Rückreaktion initiiert werden. Die beleuchtete Stelle erscheint dann violett (B). Durch den Einsatz des Lichtleiters kann der Bereich der photochemischen Anregung klein gehalten werden, so daß nur ein kleiner Bereich der Schicht photochemisch angeregt wird. Dadurch entsteht ein gut sichtbarer Farbkontrast zwischen der gelben und der violetten Fläche.

Es konnte gezeigt werden, daß statt des Laserlichts auch der Einsatz von Photodioden oder von herkömmlichen Halogenlampen dessen Licht mit einem Kurzpassfilter gefiltert wurde, möglich war.

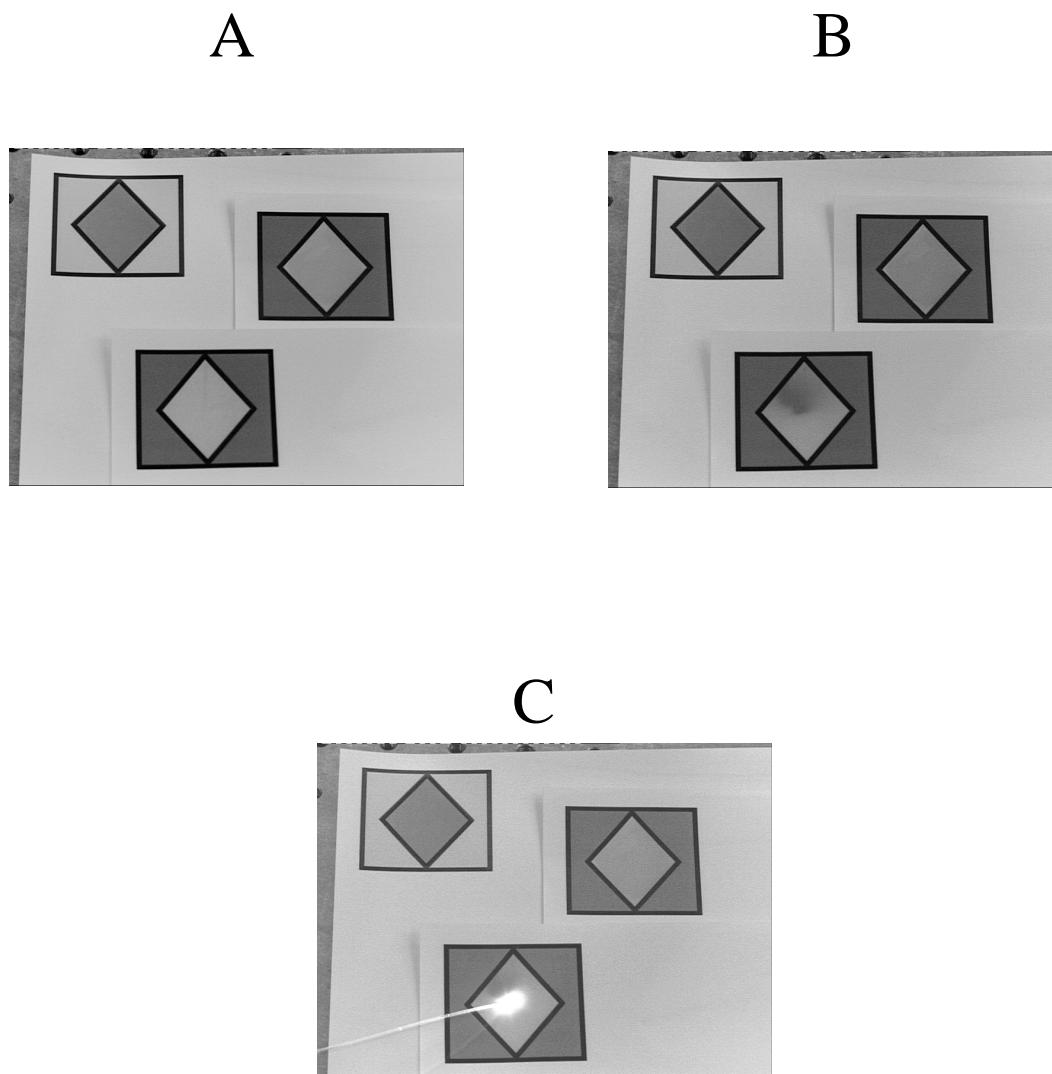


Abb. 45: Sicherheitsschutz mit inverser Photochemie. Im gezeigten Beispiel wurde die photochemische Reaktion von M nach B ausgenutzt. Die Lichtempfindlichkeit der Schicht ist so groß, daß sie bei normalem Tageslicht vollständig durchbleicht. Zur Demonstration der Dokumentenechtheit wird in (C) blaues Licht ($\lambda=413$ nm) verwendet.

7.5 Zusammenfassung

Ziel war die Entwicklung von Zubereitungen aus Bakteriorhodopsin (BR) und Hilfsstoffen, die als Druckfarben bzw. -tinten verwendet werden können, mit dem Hintergrund, die Möglichkeit des Einsatzes von Bakteriorhodopsin in der Sicherheitstechnik unter Beweis zu stellen („proof of principle“).

Es konnten Zubereitungen für den Siebdruck und den Offsetdruck entwickelt werden, die mittels gängiger Drucktechniken appliziert werden konnten. Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Durchführung war dabei die Verfügbarkeit von PM in gefriergetrockneter Form. Im Rahmen der Arbeiten konnte das Verfahren zur Gefriertrocknung optimiert werden, so daß eine gleichbleibende Qualität der Ausgangssubstanz (PM) sichergestellt war.

Bei der Entwicklung der Siebdruckfarbe wurde zum einen auf bestehende Systeme ohne Pigmentzusatz zurückgegriffen, auf der anderen Seite wurde eine druckbare Mischung mit PVAL als Matrixmaterial entwickelt. Bei dieser Entwicklung stellte die Untersuchung der rheologischen Eigenschaften einen zentralen Aspekt dar. Dabei wurde eine herkömmliche Siebdruckfarbe als Referenz verwendet. Die rheologischen Eigenschaften der entwickelten Farbe wurde dann denen der herkömmlichen Farbe angepaßt. Neben den rheologischen Eigenschaften wurde der Oberflächenverlauf der Farbe nach dem Druck optimiert und Wege zur Schaumvermeidung durch den Einsatz von Entschäumern beim Druck aufgezeigt.

Bei der Herstellung der Offset-Farbe wurde auf eine bestehende Mischung ohne Pigmente zurückgegriffen. Die Durchführung der Applikationsstudien wurde dabei von einer externen Firma (Fa. Gebr. Schmitt) übernommen. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, daß das biologische Material PM sowohl mit der UV- härtenden Offset-Farbe verträglich ist und zerstörungsfrei im Offsetdruck appliziert werden kann. Damit konnte der Beweis erbracht werden, daß PM in einem hochreproduzierenden Druckverfahren einsetzbar ist.

Mit den mittels Siebdruck angefertigten Demonstrationsbeispielen, konnte die Verwendung von BR in der Sicherheitstechnik demonstriert werden. Ein entscheidender Punkt war in allen Fällen die Einstellung der Lichtempfindlichkeit der Schichten. Dabei wurden verschiedene Substanzen als Hilfsstoffe getestet und eingesetzt. Erfahrungen und Ergebnisse, die bei der Filmherstellung für die Holographische Interferometrie gemacht wurden, konnten dabei genutzt werden.

Neben dem Einsatz zur Sicherstellung der Dokumentenechtheit, ist ein Einsatz von BR auch in Zugangskontrolleinrichtungen denkbar. Hier käme zudem die hohe Reversibilität von BR zum Tragen. Um von der hier aufgezeigten prinzipiellen Anwendung zu einer marktreifen Anwendung zu gelangen, müssen für viele Probleme, wie z.B. die Wasserbeständigkeit der verdruckten Schichten noch Lösungsansätze erforscht und aufgezeigt werden.

8 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde das Membranprotein Bakteriorhodopsin im Hinblick auf technische Anwendungen untersucht und optimiert. Neben einer neuen Methode zur schonenden enzymatischen Quervernetzung sollte der Einsatz in der Sicherheitstechnik aufgezeigt werden. Für die holographische Interferometrie sollten die photochemischen Eigenschaften von BR-Filmen optimiert werden.

Quervernetzung mit BTGase

Es wurde eine neue Methode entwickelt, wie Bakteriorhodopsin in membrangebundener Form enzymatisch quervernetzt werden kann. Dabei wurde auf die bakterielle Transglutaminase aus *Streptoverticillum mobaraense* zurückgegriffen. Die Quervernetzung gestaltet sich äußerst einfach und findet unter sehr schonenden Bedingungen statt. Der Nachweis, daß BR ein BTGase Substrat ist, hat praktische Relevanz für die Filmherstellung. Im günstigsten Fall ist dadurch die Herstellung eines trägerfreien BR-Films möglich. In jedem Fall sollte es jedoch machbar sein, BR an ein geeignetes Matrixmaterial in einem Einschnittprozeß kovalent anzubinden. Damit können bei der Filmherstellung neue Wege beschritten werden.

Kinetische Optimierung von Bakteriorhodopsinfilmen

Die holographische Interferometrie ist ein Verfahren, bei dem Eigenschaften von Bakteriorhodopsin, wie die Reversibilität und der Dichroismus als holographisches Aufzeichnungsmedium genutzt werden können. Grundvoraussetzung für einen Einsatz in der Holographie ist die Herstellung von Bakteriorhodopsinfilmen. Neben der optischen Homogenität der Filme ist die Lichtempfindlichkeit der Filme ein maßgeblicher Parameter. Sie entscheidet in Kombination mit der Leistung des verwendeten Lasers über die Größe der Objekte, die untersucht werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Verfahren zur Filmherstellung entwickelt, das die Herstellung flächenunlimitierter (homogener) Filme erlaubt. Im Rahmen der Arbeit kamen Filme mit einer Apertur von 90 mm x 90 mm zum Einsatz. Mit ihnen wurde ein Holographiesystem realisiert, das eine Aufzeichnung ohne abbildende Optik ermöglicht. Linsen werden bei der Verwendung kleinerer Filme zur Abbildung großer Objekte benötigt, limitieren aber mit ihrer Auflösung (ca. 300 Linien/mm) die Gesamtauflösung des Systems. Die volle Auflösung des Aufzeichnungsmediums Bakteriorhodopsin (5000 Linien/mm) kann dann nicht ausgenutzt

werden.

Des Weiteren wurde die Lichtempfindlichkeit der Bakteriorhodopsinfilme optimiert. Neben dem pH-Wert spielt dabei der Wassergehalt der Filme eine entscheidende Rolle. Durch einen reduzierten Wassergehalt der Probe wird die Kinetik der thermischen Reaktion von M nach B aber auch der Reaktion von B nach M beeinflusst. In diesem Fall kann das herkömmliche Zwei-Zustandsmodell nicht mehr verwendet werden. Die Eigenschaften von BR müssen dann mit einem neu eingeführten Modell beschrieben werden.

Für die Mutante D96N konnte gezeigt werden, daß die optimale Lichtempfindlichkeit bei hohen Wassergehalten der Filme erreicht wird. Für BR-WT durchläuft die Lichtempfindlichkeit in Abhängigkeit vom Wassergehalt ein Optimum, erreicht aber in keinem Fall die Lichtempfindlichkeit von D96N. Da die Einstellung eines hohen Wassergehalts wesentlich einfacher als die genaue Einstellung eines Optimums ist, gestaltet sich die Herstellung von Bakteriorhodopsinfilmen mit der Mutante D96N wesentlich einfacher. Die Mutante D96N ist also dem Wildtyp bei der Filmherstellung für die holographische Interferometrie vorzuziehen.

Die Filme mit der optimierten Lichtempfindlichkeit konnten bei der interferometrischen Untersuchung von Keramikventilen erfolgreich eingesetzt werden. Mit ihnen wurde bei gleichen Bedingungen eine Signalverbesserung um den Faktor 50 erreicht.

Einsatz in der Sicherheitstechnik

Ein Einsatz photochromer Materialien in der Sicherheitstechnik wird seit längerem erwogen. Problematisch bei der Verwendung herkömmlicher synthetischer Materialien ist, daß zur Sichtbarmachung UV-Licht verwendet werden muß und daß die Schaltzyklenzahl dieser Materialien begrenzt ist. Deshalb sollte die Möglichkeit des Einsatzes von Bakteriorhodopsin in der Sicherheitstechnik demonstriert werden. Im Gegensatz zu herkömmlichen synthetischen Materialien zeichnet Bakteriorhodopsin sich durch eine hohe Reversibilität und einen Farbwechsel (violett/gelb) im sichtbaren Bereich aus. Möglich ist ein Einsatz in diesem kostensensitiven Bereich, da die Senkung der Herstellungskosten von Bakteriorhodopsin durch optimierte Herstellungsbedingungen abzusehen ist.

Grundvoraussetzung für den Einsatz war die Entwicklung einer Druckfarbe, die Bakteriorhodopsin in aktiver Form als Pigment enthält, und die über ein gängiges Druckverfahren applizierbar ist. Als Beispiel wurde dabei das Siebdruckverfahren gewählt.

Auf Polyvinylalkohol-Basis konnte eine druckfähige Mischung entwickelt werden. Damit kann-

ten Demonstrationsbeispielen erstellt werden und der prinzipielle Einsatz von Bakteriorhodopsin in der Sicherheitstechnik aufgezeigt werden.

Neben diesem Verfahren wurde auch das Verfahren des Offsetdruckes erfolgreich eingesetzt. Bemerkenswert ist dabei die Stabilität von BR in membrangebundener Form. Diese Applikation ist hochreproduzierend, an das photochrome Pigment werden durch die beim Druck auftretenden Schekräfte, die Lösungsmittel und die Hilfsstoffe (Entschäumer, Haftvermittler) in der Farbe aber besondere Anforderungen gestellt. Der Einsatz von Bakteriorhodopsin in dieser Drucktechnik unterstreicht die außergewöhnliche Stabilität von Bakteriorhodopsin in membrangebundener Form und damit die Möglichkeit der Integration in einen technischen Prozeß..

Durch das Verdrucken des biologischen Materials Bakteriorhodopsin in aktiver Form wurden die Grundlagen für eine neue Anwendung von Bakteriorhodopsin gelegt.

9 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Kayser O., Müller R.H.
Pharmazeutische Biotechnologie
Deutsche Apotheker Zeitung 45 (1999) 53-59
- [2] Norbert Lossau
Hausputz nach dem Vorbild der Natur
Philip Morris Forschungspreis (1999)
- [3] J. K. Lanyi
Understanding Structure and Function in the Light-Driven Proton Pump Bacteriorhodopsin
J. Struct. Biol. 124 (1998) 164-178
- [4] N. Hampp
Applications of Bacteriorhodopsin
Chem. Rev. (accepted)
- [5] U. Haupts; J. Tittor; D. Oesterhelt
Closing in on bacteriorhodopsin: Progress in Understanding the molecule
Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 28 (1999) 367-399
- [6] W. A. Havelka; R. Henderson; D. Oesterhelt
Three-dimensional structure of halorhodopsin at 7 Å resolution
J. Mol. Biol. 247 (1995) 726-738
- [7] D. Oesterhelt
Structure and Function of Halorhodopsin
Israel J. Chem. 35 (1995) 475-494
- [8] 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. 93 (1996) 8230-8235

- [9] K. J. Hellingwerf; W. D. Hoff; W. Crielaard
Photobiology of microorganisms: how photosensors catch a photon to initialize signalling
Mol. Microbiol. 21 (1996) 683-693
- [10] W. Marwan; D. Oesterhelt
Biochemische Mechanismen einer einfachen Verhaltensreaktion
Chem. unserer Zeit 33 (1999) 140-151
- [11] D. L. Worcester; R. G. Miller; P. J. Bryant
Atomic force microscopy of purple membranes
J. Microsc. 152 (1988) 817-821
- [12] R. Henderson; P. N. T. Unwin
Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy
Nature 257 (1975) 28-32
- [13] A. E. Blaurock; W. Stoeckenius
Structure of the purple membrane
Nature, New Biol. 233 (1971) 152-155
- [14] D. Oesterhelt; C. Bräuchle; N. Hampp
Bacteriorhodopsin: a biological material for information processing
Q. Rev. Biophys. 24 (1991) 425-478
- [15] C. R. Woese
Archaeobacteria
Sci. Am. 244 (1981) 94-106
- [16] Y. Shen; C. R. Safinya; K. S. Liang; A. F. Ruppert; K. J. Rothschild
Stabilization of the membrane protein bacteriorhodopsin to 140°C in two-dimensional films
Nature 366 (1993) 48-50
- [17] H. Luecke; H. T. Richter; J. K. Lanyi
Proton transfer pathways in bacteriorhodopsin at 2.3 angstrom resolution
Science 280 (1998) 1934-1937

- [18] E. Gouaux
It's not just a phase: crystallization and X-ray structure determination of bacteriorhodopsin in lipidic cubic phases
Structure (London) 6 (1998) 5-10
- [19] G. Rummel; A. Hardmeyer; C. Widmer; M. L. Chiu; P. Nollert; K. P. Locher; I. Pedruzzi; E. M. Landau; J. P. Rosenbusch
Lipidic cubic phases: new matrixes for the three-dimensional crystallization of membrane proteins
J. Struct. Biol. 121 (1998) 82-91
- [20] H. Luecke; B. Schobert; H. T. Richter; J. P. Cartailler; J. K. Lanyi
Structural Changes in Bacteriorhodopsin During Ion Transport at 2 Angstrom Resolution
Science 286 (1999) 255-260
- [21] J. K. Lanyi
Pathways of proton transfer in the light-driven pump bacteriorhodopsin
Experientia 49 (1993) 514-517
- [22] T.A. Ceska, K.H. Downing, J.M. Baldwin, R.Henderson N. Grigorieff
Electron-crystallographic Refinement of the Structure of Bakteriorhodopsin
J. Mol. Biol. 259 (1996) 293-421
- [23] H. Houjou; Y. Inoue; M. Sakurai
Physical Origin of the Opsin Shift of Bacteriorhodopsin. Comprehensive Analysis Based on Medium Effect Theory of Absorption Spectra
J. Am. Chem. Soc. 120 (1998) 4459-4470
- [24] G. Varo; J. K. Lanyi
Pathways of the rise and decay of the M photointermediate(s) of bacteriorhodopsin
Biochemistry 29 (1990) 2241-2250
- [25] O. Kalisky; C. R. Goldschmidt; M. Ottolenghi
On the photocycle and light adaptation of dark-adapted bacteriorhodopsin
Biophys. J. 19 (1977) 185-189
- [26] T. Kouyama; R. A. Bogomolni; W. Stoeckenius
Photoconversion from the light-adapted to the dark-adapted state of bacteriorhodopsin
Biophys. J. 48 (1985) 201-208

- [27] R. Govindjee; S. P. Balashov; T. G. Ebrey
Quantum efficiency of the photochemical cycle of bacteriorhodopsin
Biophys. J. 58 (1990) 597-608
- [28] 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 37 (1998) 8088-8096
- [29] R. Rammelsberg; G. Huhn; M. Luebben; K. Gerwert
Bacteriorhodopsin's intramolecular proton-release pathway consists of a hydrogen-bonded network
Biochemistry 37 (1998) 5001-5009
- [30] N. Hampp; M. Sanio; K. Anderle
High-resolution direct-view display based on the biological photochromic material bacteriorhodopsin
Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng. 3636 (1999) 40-47
- [31] S. P. Balashov; M. Lu; E. S. Imasheva; R. Govindjee; T. G. Ebrey; B. Othersen III; Y. Chen; R. K. Crouch; D. R. Menick
The Proton Release Group of Bacteriorhodopsin Controls the Rate of the Final Step of Its Photocycle at Low pH
Biochemistry 38 (1999) 2026-2039
- [32] V. B. Taranenko
Real-time holography on bacteriorhodopsin-based materials
Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng. 3486 (1998) 126-130
- [33] S. Thai; J. Malowicki; Q. W. Song
Bacteriorhodopsin optical switch
Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng. 3384 (1998) 107-118
- [34] C. Ritzel; K. Meerholz; C. Braeuchle; D. Oesterhelt
Spatial light modulation with a bacteriorhodopsin-driven liquid-crystal cell
Mol. Cryst. Liq. Cryst. Sci. Technol. A 315 (1998) 443-448

- [35] V. K. Salakhutdinov; G. A. Matevosov; Y. V. Konstantinov
Bacteriorhodopsin as a fast recording medium
Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng. 3347 (1998) 20-26
- [36] M. Tsuda; R. Govindjee; T. G. Ebrey
Effects of pressure and temperature on the M412 intermediate of the bacteriorhodopsin photocycle.
Implications for the phase transition of the purple membrane
Biophys. J. 44 (1983) 249-254
- [37] R. H. Lozier; A. Xie; J. Hofrichter; G. M. Clore
Reversible steps in the bacteriorhodopsin photocycle
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89 (1992) 3610-3614
- [38] E. P. Lukashev; E. Vozary; A. A. Kononenko; A. B. Rubin
Electric field promotion of the bacteriorhodopsin BR570 to BR412 photoconversion in films of
Halobacterium halobium purple membranes
Biochim. Biophys. Acta 592 (1980) 258-266
- [39] R. Korenstein; B. Hess
Hydration effects on the photocycle of bacteriorhodopsin in thin layers of purple membrane
Nature 270 (1977) 184-186
- [40] M. E. Edgerton; T. A. Moore; C. Greenwood
Investigations into the effect of acid on the spectral and kinetic properties of purple membrane from
Halobacterium halobium
Biochem. J. 189 (1980) 413-420
- [41] E. Kölling; W. Gärtner; D. Oesterhelt; L. Ernst
Sterically Fixed Retinal-Analogue Prevents Proton-Pumping Activity in Bacteriorhodopsin
Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 23 (1984) 81-82
- [42] V. Balogh-Nair; K. Nakanishi
Synthetic analogs of retinal, bacteriorhodopsin, and bovine rhodopsin
Methods Enzymol. 88 (1982) 496-506
- [43] J. R. Bell; R. S. Muthyala; R. W. Larsen; M. Alam; R. S. H. Liu
Photoactivities of the Red-Shifted Azulenenic Bacteriorhodopsin Analogs
J. Phys. Chem. A 102 (1998) 5481-5483

- [44] D. Oesterhelt; G. Krippahl
Phototrophic growth of halobacteria and its use for isolation of photosynthetically-deficient mutants
Ann. Microbiol. (Paris) 134B (1983) 137-150
- [45] E. Ferrando; U. Schweiger; D. Oesterhelt
Homologous bacterio-opsin-encoding gene expression via site-specific vector integration
Gene 125 (1993) 41-47
- [46] A. Miller; D. Oesterhelt
Kinetic optimization of bacteriorhodopsin by aspartic acid 96 as an internal proton donor
Biochim. Biophys. Acta 1020 (1990) 57-64
- [47] L. Greenspan
Humidity Fixed Points of Binary Saturated Aqueous Solutions
J. Res. Nat. Bur. Stand. 81A (1977) 89-96
- [48] R. C. Weast; Astle M. J.
CRC Handbook of Chemistry and Physics 62. Aufl. (1981)
- [49] D. Oesterhelt; W. Stoeckenius,
Isolation of the Cell Membrane of Halobacterium Halobium and Its Fractionation into Red and Purple Membrane,
Academic Press, 1974 667-678
- [50] U. Gerber; U. Jucknischke; S. Putzien; H-L. Fuchsbaauer
A rapid and simple method for the purification of transglutaminase from *Streptovercillium mobaraense*
Biochem. J. 299 (1994) 825-829
- [51] N. Grossowicz; E. Wainfang; E. Borek; H. Waelsch
The enzymatic formation of hydroxamic acids from glutamine and asparagine.
J. Biol. Chem. 187 (1950) 111-125
- [52] U. K. Laemmli
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4
Nature 227 (1970) 680_685

- [53] H. Blum; H. Beier; H. J. Gross
Improved silver staining of plant-proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels
Electrophoresis 8 (1987) 93-99
- [54] U. Reinhardt
Rotationsrheometrie ein Blick in die Zukunft
Applied Rheology (1997) 25-31
- [55] Q. W. Song; C. Zhang; R. Blumer; R. B. Gross; Z. Chen; R. R. Birge
Chemically enhanced bacteriorhodopsin thin-film spatial light modulator
Opt. Lett. 18 (1993) 1373-1375
- [56] G. Varo; J. K. Lanyi
Pathways of the rise and decay of the M photointermediate(s) of bacteriorhodopsin
Biochemistry 29 (1990) 2241-2250
- [57] G. Varo; J. K. Lanyi
Distortions in the photocycle of bacteriorhodopsin at moderate dehydration
Biophys. J. 59 (1991) 313-322
- [58] M. Yoshida; K. Ohno; Y. Takeuchi; Y. Kagawa
Prolonged lifetime of the 410 nm intermediate of bacteriorhodopsin in the presence of guanidine hydrochloride
Biochem. Biophys. Res. Commun. 75 (1977) 1111-1116
- [59] N. Hampp, C. Bräuchle, D. Oesterhelt R. Thoma
Bacteriorhodopsinfilms as spatial light modulators for nonlinear optical filtering
Opt. Lett 16 (1991) 651-653
- [60] S. Y. Zaitsev; N. M. Kozhevnikov; Y. O. Barmenkov; M. Y. Lipovskaya
Kinetics of dynamic hologram recording in polymer films with immobilized bacteriorhodopsin
Photochem. Photobiol. 55 (1992) 851-856
- [61] The science and the technology of gelatin
Academic Press, 1997

- [62] E. Schacht; J. C. Vandichel; A. Lemahieu; N. de Rooze; S. Vansteenkiste
The use of gelatin and alginate for the immobilization of bioactive agents.
Spec. Publ. - R. Soc. Chem. 138 (1993) 18-34
- [63] Z. Bayramoglu; U. Akbulut; S. Sungur
Immobilization of α -amylase into gelatin films with various crosslinkers.
Bioorg. Med. Chem. Lett. 2 (1992) 427-432
- [64] S. Sungur; M. Elcin; U. Akbulut
Studies on immobilization of urease in gelatin by cross-linking.
Biomaterials 13 (1992) 795-800
- [65] S. B. Ross-Murphy
Structure and rheology of gelatin gels: recent progress.
Polymer 33 (1992) 2622-2627
- [66] A. Wexler
A Connectivity model for Covalent Cross-linking in a Thermally Reversible Gel. Evidence for Latent Covalent Network Formation in the Formaldehyde Cross-linking of Gelatin Gel.
J. Am. Chem. Soc. 109 (1987) 5905-5909
- [67] Photographie
Ullmanns Encyclopedie der technischen Chemie 18 (1979) 399-500
- [68] M. Yamazaki; J. Goodisman; R. R. Birge
Quadratic electro-optic effects in bacteriorhodopsin: Measurement of $\gamma(-\varpi;0,0, \varpi)$ in dried gelatin thin films
J. Chem. Phys. 108 (1998) 5876-5887
- [69] D. Oesterhelt
Bacteriorhodopsin as a light-driven ion exchanger?
FEBS Lett. 64 (1976) 20-22
- [70] H. W. Trissl
Primary electrogenic processes in bacteriorhodopsin probed by photoelectric measurements with capacitative metal electrodes. I
Biochim. Biophys. Acta 806 (1985) 124-135

- [71] K. Singh; S. R. Caplan
The purple membrane and solar energy conversion
Trends Biochem. Sci. 5 (1980) 62-64
- [72] T. Konishi; S. Tristram; L. Packer
The effect of cross-linking on photocycling activity of bacteriorhodopsin
Photochem. Photobiol. 29 (1979) 353-358
- [73] Y. Harada; K. Yasuda; S. Nomura; N. Kajimura; Y. C. Sasaki
Vectorially Oriented Fixation of Membrane-Embedded Bacteriorhodopsin onto an Inert Base
Langmuir 14 (1998) 1829-1835
- [74] H. Ando; M. Adachi; K. Umeda; A. Matsuura; M. Nonaka; R. Uchio; H. Tanaka; M. Motoki
Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms
Agric. Biol. Chem. 53 (1989) 2613-2617
- [75] The e-(8-glutamyl)lysine cross-link and the catalytic role of transglutaminases
Folk, J.E.; Finlayson, J.S.
Adv. Protein Chem. 31 (1977) 1-133
- [76] J. J. Gorman; J. E. Folk
Structural features of glutamine substrates for transglutaminases: specificities of human plasma factor XIIIa and the guinea pig liver enzyme towards synthetic peptides
J. Biol. Chem. 256 (1984) 2712-2715
- [77] J. Bridgen; I. D. Walker
Photoreceptor protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. Molecular weight and retinal binding site
Biochemistry 15 (1976) 792-798
- [78] R. R. Birge
Nature of the primary photochemical events in rhodopsin and bacteriorhodopsin
Biochim. Biophys. Acta 1016 (1990) 293-327
- [79] Consortium für elektrochemische Industrie GmbH
Purple membrane preparations having increased holographic diffraction efficiency
US 5374492 (1994)

- [80] J. D. Downie; D. T. Smithey
Measurements of holographic properties of bacteriorhodopsin films
Appl. Opt. 35 (1996) 5780-5789
- [81] M. Nakasako; M. Kataoka; F. Tokunaga
Arginine Remarkably Prolongs the Lifetime of the M-Intermediate in the Bacteriorhodopsin Photocycle at Room Temperature
FEBS Lett. 254 (1989) 211-214
- [82] H. Otto; T. Marti; M. Holz; T. Mogi; M. Lindau; H. G. Khorana; M. P. Heyn
Aspartic acid-96 is the internal proton donor in the reprotonation of the Schiff base of bacteriorhodopsin
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86 (1989) 9228-9232
- [83] 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 30 (1991) 10972-10979
- [84] K. J. Rothschild; T. Marti; S. Sonar; Y. W. He; P. Rath; W. Fischer; H. G. Khorana
Asp96 deprotonation and transmembrane α -helical structural changes in bacteriorhodopsin
J. Biol. Chem. 268 (1993) 27046-27052
- [85] O. Bousche; M. Braiman; Y. W. He; T. Marti; H. G. Khorana; K. J. Rothschild
Vibrational spectroscopy of bacteriorhodopsin mutants. Evidence that Asp-96 deprotonates during the M \rightarrow N transition
J. Biol. Chem. 266 (1991) 11063-11067
- [86] M. Holz; L. A. Drachev; T. Mogi; H. Otto; A. D. Kaulen; M. P. Heyn; V. P. Skulachev; H. G. Khorana
Replacement of aspartic acid-96 by asparagine in bacteriorhodopsin slows both the decay of the M intermediate and the associated proton movement
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86 (1989) 2167-2171
- [87] T. V. Dyukova; E. P. Lukashev
Dehydration effects on D96N bacteriorhodopsin films
Thin Solid Films 283 (1996) 1-4

- [88] R. Govindjee; S. P. Balashov; T. G. Ebrey
Quantum efficiency of the photochemical cycle of bacteriorhodopsin
Biophys. J. 58 (1990) 597-608
- [89] J. Tittor; D. Oesterhelt
The quantum yield of bacteriorhodopsin
FEBS Lett. 263 (1990) 269-273
- [90] 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. 54 (1991) 955-961
- [91] 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. 98 (1994) 10674-10677
- [92] 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. 96 (1992) 6055-6061
- [93] M. Weik; G. Zaccai; N. A. Dencher; D. Oesterhelt; T. Hauß
Structure and Hydration of the M-state of the Bacteriorhodopsin Mutant D96N Studied by Neutron Diffraction
J. Mol. Biol. 275 (1998) 625-634
- [94] H. Fouckhardt
Photonik, Teubner Verlag, 1994
- [95] P. Hariharan
Optical Holography, Cambridge University Press, 1996
- [96] D. Garbor
A New Microscopic Principle
Nature 161 (1948) 777

- [97] J. Upatnieks E. N. Leith
Reconstructed wavefronts and Communication theory
J. Opt. Soc. Am. 52 (1962) 1123
- [98] L.O. Heflinger, R. R. E. Brooks
Interferometry with a Holographically Reconstructed Comparison Beam
Appl. Phys. Lett. 7 (1965) 248-249
- [99] E. T. Doherty, K. S. Pennington R. J. Collier
Application of Moire Techniques to Holography
Appl. Phys. Lett 7 (1965) 223-225
- [100] R. M. Grant, G. W. Stroke G. M. Brown
Theory of Holographic Interferometry
J. Acoust. Soc. Am. 45 (1969) 1166-1187
- [101] N. M. Burykin; E. Y. Korchemskaya; M. S. Soskin; V. B. Taranenko; T. V. Dukova; N. N. Vsevolodov
Photoinduced anisotropy in Bio-chrom films
Opt. Commun. 54 (1985) 68-70
- [102] Q. W. Song; Y.-H. Zhang; R. R. Birge; J. D. Downie
Photoinduced anisotropy in bacteriorhodopsin films
Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng. 3470 (1998) 226-230
- [103] N. Hampp; A. Seitz; T. Juchem; D. Oesterhelt
Large diameter bacteriorhodopsin films for applications in non-destructive testing
Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng. 3623 (1999) 243-251
- [104] H. Kogelnik
Coupled Wave Theory for Thick Hologram Gratings
Bell Syst. Tech. J. 48 (1969) 2909-2947
- [105] D. Zeisel; N. Hampp
Spectral relationship of light-induced refractive index and absorption changes in bacteriorhodopsin films containing wildtype BRWT and the variant BRD96N
J. Phys. Chem. 96 (1992) 7788-7792

- [106] Labels & Labeling Data & Consultancy Services Ltd
Products and image security
- [107] J. D. Brongers
Search for effective document security by "inventioning".
Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng. 3314 (1998) 29-38
- [108] David Pizzanelli
Counterfeit holograms and simulations
Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng. 3314 (1998) 86-96
- [109] B Batchelor; N. Stephens
Image analysis of photochromic ink for security applications
Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng. 2055 (1993) 310-323
- [110] Plessey Co. PLC, UK
Marking of articles with photochromic compounds
WO 8801288 A1 (1988)
- [111] SICPA Holding S. A.
Security document with reversibly photochromic printing inks
US 5807625 (1998)
- [112] Plessey Co. PLC, UK
Irreversible photochromic markings
WO 8800223 A1 (1988)
- [113] Neuman S., Leigeber H.
Process for the preparation of purple membrane containing bacteriorhodopsin
US 5079148 (1992)
- [114] Finch
Polyvinyl Alcohol, Properties und Applications, Wiley, 1973
- [115] Druchtechniken
Ullmanns Encyclopedie der technischen Chemie 10 (1979) 188-199

-
- [116] S. Druckmann; N. Friedman; J. K. Lanyi; R. Needleman; M. Ottolenghi; M. Sheves
The back photoreaction of the M intermediate in the photocycle of bacteriorhodopsin: mechanism
and evidence for two M species
Photochem. Photobiol. 56 (1992) 1041-1047
- [117] M. T. Madigan, Barry L. Mairs
Extremisten des Lebens
Spektrum der Wissenschaft 6 (1997) 86-93

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt:

- Prof. Dr. N. Hampp für die Bereitstellung des Themas, die Möglichkeit es nach meinen Vorstellungen bearbeiten zu können und seine Diskussionsbereitschaft zu jeder Zeit, die nicht unwesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.
- Prof. Dr. D. Oesterhelt und seinem Arbeitskreis für die Herstellung und Reinigung der PM Suspensionen und die wertvollen Anregungen und Diskussionen.
- Prof. Dr. H.-L. Fuchsbauer und seinem Arbeitskreis für die Versorgung mit Bakterieller Transglutaminase und die fruchtbare Zusammenarbeit.
- der Feinmechanischen und der Elektronischen Werkstatt für die prompte Erledigung aller Aufträge und die hilfreichen Tipps und Ratschläge.
- Ralf Pasternack für seine Hilfsbereitschaft und die Geduld bei der Durchführung des ein oder anderen biochemischen Experimentes.
- Thorsten J. für die Unterstützung bei den holographischen Experimenten und für die Hilfe beim Sammeln von Weltcup-Punkten.
- Regine G. und Alexander G. für die gewissenhafte Durchsicht des Manuskriptes.
- Markus S. für das Kreuzen der Strahlen, die hitzigen Diskussionen und die Grillpartys in Wetter.
- Christoph P. für die Fachsimpeleien über Eintracht Frankfurt und überhaupt
- Martin N., Frank S., Klaus A., Frank N., Hee-Chol K., Markus M., Tilmann K., Sandra B., Sandra, K., Steffi L. und Jutta H. für die einzigartig Arbeitsatmosphäre und die unvergesslichen Ramadamas und Meckerstunden.
- Allen ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises, HiWis und Vertiefern, die jeder auf seine Weise zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.
- Hans-Jürgen B. und Jürgen A. für das Quod.
- Birgit neben Tausend Sachen dafür, daß Sie mich in den dunklen Tagen der Promotion ertragen hat.