

Kapitel 2

Mathematische und physikalische Grundlagen

2.1 Mathematische Beschreibung der Kinetik

Bei einem thermischen Relaxationsprozeß wie dem Photozyklus von bR nach der Lichtanregung kann in erster Näherung von Reaktionsschritten erster Ordnung ausgegangen werden. Die mathematische Beschreibung erfolgt also durch ein homogenes System linearer Differentialgleichungen:

$$\dot{\vec{n}}(t) = \mathbf{K} \vec{n}(t) \quad (2.1)$$

Die Komponenten des Spaltenvektors $\vec{n}(t)$ seien die relativen Konzentrationen der Intermediate zur Zeit t , und \mathbf{K} ist die sogenannte Ratenmatrix, deren Einträge K_{ij} die mikroskopischen Raten für die Übergänge vom Intermediat j zum Intermediat i sind¹ und damit das Photozyklusmodell definieren. Aus Gründen der „Teilchenerhaltung“ ($\sum_i \dot{n}_i(t) \stackrel{!}{=} 0$) müssen die Diagonalelemente der Ratenmatrix der Bedingung

$$K_{ii} = - \sum_{j \neq i} K_{ji} \quad (2.2)$$

genügen. Für die Nichtdiagonalelemente müssen noch weitere Bedingungen erfüllt sein, die als Reziprozitätsbeziehungen oder „law of detailed balance“ bezeichnet werden [Ons31]:

$$K_{ab}K_{bc}K_{ca} = K_{ac}K_{cb}K_{ba} \quad (2.3)$$

Damit besteht die Ratenmatrix, die n Intermediate miteinander verküpft, aus $(\frac{n^2}{2} - \frac{n}{2} - 2)$ unabhängigen Raten, wenn noch angenommen wird, daß aus dem n -ten Zustand keine Rückreaktionen stattfinden [Nag91]. Durch die Bedingungen (2.2) und (2.3) ist sichergestellt, daß die Eigenwerte der Ratenmatrix k_j^* reell und nichtpositiv sind [Hak83]. Unter der Voraussetzung, daß diese Eigenwerte nicht entartet sind², ergibt sich als Lösung der Differentialgleichung (2.1):

$$\vec{n}(t) = \mathbf{C} \exp(t\vec{k}^*) \quad (2.4)$$

¹Diese Definition für K_{ij} und die Formulierung der DGL(2.1) entsprechen der üblichen Konvention für die Matrizenmultiplikation

²Bei Entartung treten auch Terme der Gestalt $t^l e^{tk_j^*}$ auf, mit $l = 1..(r - 1)$, wenn r der Entartungsgrad ist

wobei $\exp(t\vec{k}^*)$ ein Spaltenvektor mit den Einträgen $e^{tk_j^*}$ ist. An Stelle der Eigenwerte k_j^* verwendet man üblicherweise die apparenten Zeitkonstanten $\tau_j = -\frac{1}{k_j^*}$. Sei $\mathbf{D}(\vec{k}^*)$ eine Diagonalmatrix mit den Elementen k_j^* , dann muß die Koeffizientenmatrix \mathbf{C} der Beziehung

$$\mathbf{K} = \mathbf{C} \mathbf{D}(\vec{k}^*) \mathbf{C}^{-1} \quad (2.5)$$

genügen, d.h. \mathbf{C} diagonalisiert die Ratenmatrix. Durch die Anfangsbedingung

$$\vec{n}(t=0) = \mathbf{C} \begin{pmatrix} 1 \\ \vdots \\ 1 \end{pmatrix} \quad (2.6)$$

ist \mathbf{C} eindeutig bestimmt.

2.1.1 Die Absorption als „Observable“ der Kinetik

Die zeitliche Änderung der Intermediatskonzentrationen $n_i(t)$ läßt sich im allgemeinen nicht direkt beobachten. In einem Absorptionsexperiment ist vielmehr eine lineare Überlagerung der im Zyklus auftretenden Intermediate mit den jeweiligen Absorptionen $A_i(\lambda)$ als Meßgröße zugänglich:

$$A(\lambda, t) = \sum_{i=1}^n A_i(\lambda) n_i(t) \quad (2.7)$$

Anstatt den zeitlichen Verlauf der Absorption als absolute Größe zu betrachten, ist es meistens zweckmäßig, die Absorptionsänderung bezüglich des Grundzustandes, der in der Reaktionskaskade auch der Endzustand ($A(\lambda, t_\infty) = A_n(\lambda)$) ist, zu behandeln. Mit der Erhaltungsbedingung $\sum_{i=1}^n n_i(t) \equiv 1$ ergibt sich:

$$\Delta A(\lambda, t) := A(\lambda, t) - A(\lambda, t_\infty) = \sum_{i=1}^{n-1} (A_i(\lambda) - A_n(\lambda)) n_i(t) \quad (2.8)$$

Setzt man für die transienten Intermediatskonzentrationen $n_i(t)$ die Lösung der Differentialgleichung (2.4) ein, geht Gleichung (2.8) über in die folgende Form:

$$\Delta A(\lambda, t) = \sum_{j=1}^{n-1} B_j(\lambda) e^{-t/\tau_j} \quad \text{mit} \quad B_j(\lambda) = \sum_{i=1}^{n-1} (A_i(\lambda) - A_n(\lambda)) C_{ij} \quad (2.9)$$

Die Summation über den Index der Zeitkonstanten j kann nach $n-1$ abgebrochen werden, denn wegen $A(\lambda, t_\infty) = A_n(\lambda)$ und $\tau_n \rightarrow \infty^3$ muß $B_n(\lambda) \equiv 0$ sein. Die zeitliche Entwicklung der Absorptionsänderung bei der Wellenlänge λ läßt sich also unter den oben formulierten Bedingungen als eine lineare Überlagerung von Exponentialfunktionen darstellen. Eine Anpassung bei den gemessenen Wellenlängen mit jeweils dem gleichen Satz von Exponentialfunktionen liefert demnach die Zeitkonstanten τ_j und die zugehörigen Koeffizienten $B_j(\lambda)$, die die sogenannten Amplitudenspektren darstellen. Diese Prozedur wird als „globaler Fit“ bezeichnet [Xie87, Mau87a, Mau87b]. Es sei darauf hingewiesen, daß der Informationsgehalt der Zeitkonstanten τ_j und der Amplituden $B_j(\lambda)$ im allgemeinen Fall zu gering ist, um

³Aus der Bedingung an die Diagonalelemente der Ratenmatrix Gl.(2.2) folgt automatisch, daß der Eigenwert $k_n^* = 0$ auftritt.

das System spektral und kinetisch vollständig zu charakterisieren. Die Intermediatsspektren $A_i(\lambda)$ sowie die vollständige Ratenmatrix K ergeben sich nicht eindeutig aus den in der Anpassung bestimmten Parametern.

Wie bereits in Kap. 1.3 dargelegt wurde, kommt erschwerend hinzu, daß für eine optimale Anpassung der Absorptionszeitspuren in der Regel eine größere Anzahl von Exponentialfunktionen nötig ist, als spektrale Übergänge identifiziert werden können. Für die formale Beschreibung nach Gleichung (2.9), mit einer quadratischen Matrix \mathbf{C} , wäre es demnach erforderlich, Intermediate mit entarteten, d.h. identischen, Absorptionsspektren einzuführen (z.B. $A_i(\lambda) \equiv A_{i+1}(\lambda)$).

2.1.2 Die Singulärwertzerlegung

Die Anpassung der Absorptionsänderung $\Delta A(\lambda, t)$ mit Exponentialfunktionen kann unter Umständen numerisch sehr aufwendig sein, insbesondere wenn eine große Anzahl von Wellenlängen in die Auswertung eingehen soll. Dabei ist aber ein Teil der Daten redundant. Eine Methode große Datenfelder auf linear unabhängige Vektoren zu reduzieren ist die Singulärwertzerlegung (engl. Singular Value Decomposition) [Hen92, Pre92]. Dafür wird die Gleichung 2.8 in Matrixschreibweise formuliert:

$$\Delta \mathbf{A} = (\mathbf{A} - \mathbf{A}_n) \mathbf{n} \quad (2.10)$$

Die Matrizen von Gleichung (2.10) sind dabei wie folgt aufgebaut:

$$\Delta \mathbf{A} = \begin{pmatrix} \Delta A(\lambda_1, t_1) & \Delta A(\lambda_1, t_2) & \cdots \\ \Delta A(\lambda_2, t_1) & \ddots & \\ \vdots & & \ddots \end{pmatrix} \quad \mathbf{A} = \begin{pmatrix} A_1(\lambda_1) & A_2(\lambda_1) & \cdots \\ A_1(\lambda_2) & \ddots & \\ \vdots & & \ddots \end{pmatrix}$$

$$\mathbf{A}_n = \begin{pmatrix} A_n(\lambda_1) & A_n(\lambda_1) & \cdots \\ A_n(\lambda_2) & \ddots & \\ \vdots & & \ddots \end{pmatrix} \quad \mathbf{n} = \begin{pmatrix} n_1(t_1) & n_1(t_2) & \cdots \\ n_2(t_1) & \ddots & \\ \vdots & & \ddots \end{pmatrix}$$

Die Matrix $\Delta \mathbf{A}$ wird nun durch den SVD-Algorithmus in ein Produkt von drei Matrizen zerlegt:

$$\Delta \mathbf{A} = \mathbf{U}^T \mathbf{D}(s) \mathbf{V} \quad (2.11)$$

In der Diagonalmatrix $\mathbf{D}(s)$ stehen die sogenannten Singulärwerte s , der Größe nach geordnet, \mathbf{U} und \mathbf{V} sind Matrizen mit orthonormalen Zeilenvektoren:

$$\sum_t V_{s,t} V_{s',t} = \delta_{s,s'} \quad \text{und} \quad \sum_\lambda U_{s,\lambda} U_{s',\lambda} = \delta_{s,s'} \quad (2.12)$$

Die Orthonormalitätseigenschaft gilt auch für die Spaltenvektoren der Pseudoinversen von \mathbf{U} und \mathbf{V} :

$$\sum_t V_{t,s}^{-1} V_{t,s'}^{-1} = \delta_{s,s'} \quad \text{und} \quad \sum_\lambda U_{\lambda,s}^{-1} U_{\lambda,s'}^{-1} = \delta_{s,s'} \quad (2.13)$$

Die Basisspektren werden durch die Spalten von

$$\mathbf{S} := \mathbf{U}^T \mathbf{D}(s) \quad (2.14)$$

gebildet, und die Zeilen von \mathbf{V} sind die zugehörigen Zeitspuren. Bei Anwendungen auf Photozyklusdaten von Bacteriorhodopsin sind i.allg. nur drei oder vier Basisspektren relevant, so daß die weiteren, in denen das Rauschen steckt, weggelassen werden können. Damit ist in vielen Fällen schon eine erhebliche Datenreduktion erreicht. Um eine Beziehung zwischen den Intermediatspektren \mathbf{A} und den Basisspektren \mathbf{S} bzw. zwischen den Intermediatskonzentrationen \mathbf{n} und den Basiszeitspuren \mathbf{V} herzustellen, wird folgender Ansatz gemacht:

$$(\mathbf{A} - \mathbf{A}_n) = \mathbf{S} \mathbf{X}^{-1} \quad \text{und} \quad \mathbf{n} = \mathbf{X} \mathbf{V} \quad (2.15)$$

D.h. es ist also eine geeignete Transformationsmatrix \mathbf{X} zu finden. Dieses Gleichungspaar liefert natürlich noch keine eindeutige Lösung, doch die Anzahl der Unbekannten ist erheblich reduziert, und der Parameterraum wird durch einige Nebenbedingungen eingeschränkt:

1. Die Absorption ist per definitionem positiv, deshalb sind in der Matrix \mathbf{A} nur positive Einträge zugelassen.
2. Ebenso müssen auch die Einträge von \mathbf{n} positiv sein, da es sich um (relative) Konzentrationen handelt.
3. Ferner darf die Summe der Konzentrationen einen Maximalwert, nämlich die Anregungseffizienz η , nicht übersteigen und muß monoton fallend sein ($\sum_{i=1}^{n-1} n_i(t) \leq \eta$).

2.2 Physikalische Grundlagen

2.2.1 Die Wechselwirkung von Licht mit Materie in der Dipolnäherung

Zur Beschreibung der Wechselwirkung von Licht mit Materie ist für die meisten Prozesse ein semiklassischer Ansatz zweckmäßig. Das Licht wird als (klassische) elektromagnetische Welle beschrieben, während die Materie, ein System von geladenen Teilchen – z.B. ein Molekül –, quantenmechanisch behandelt wird. Spektrale Übergänge sind als Konfigurationsänderung des Moleküls von einem stationären Zustand in einen anderen durch eine äußere Störung, nämlich das elektromagnetische Feld der Lichtwelle, zu verstehen. Der Störoperator hat dann, mit dem Vektorpotential \vec{A} und dem (quantenmechanischen) Impulsoperator des j -ten geladenen Teilchens $\frac{\hbar}{i} \vec{\nabla}_j$, die folgende Gestalt [Kli90]:

$$H' = \sum_j \left(\frac{-q_j \hbar}{i m_j c} (\vec{A} \cdot \vec{\nabla}_j) + \frac{-q_j^2}{2 m_j c^2} A^2 \right) \quad (2.16)$$

Nach Fermis Goldener Regel ergibt sich die Wahrscheinlichkeit für einen Übergang aus dem stationären Zustand n in den Zustand m :

$$W_{mn} \sim |\langle \psi_m | H' | \psi_n \rangle|^2 \quad (2.17)$$

ψ_n und ψ_m sind dabei die zeitunabhängigen Wellenfunktionen vom Ausgangszustand n und Endzustand m . Das Vektorpotential wird als ebene Welle mit Polarisationsvektor \vec{A}_0 angesetzt:

$$\vec{A} = \vec{A}_0 e^{i(\vec{k} \cdot \vec{r} - \omega t)} \quad (2.18)$$

Der Faktor $e^{i\vec{k}\cdot\vec{r}}$ läßt sich in eine Potenzreihe entwickeln:

$$e^{i\vec{k}\cdot\vec{r}} = 1 + i\vec{k}\cdot\vec{r} - \frac{1}{2}(\vec{k}\cdot\vec{r})^2 + \dots \quad (2.19)$$

Da die Wellenlänge des sichtbaren Lichts um ein Vielfaches größer ist als die räumliche Ausdehnung der elektronischen Wellenfunktion – $\vec{k}\cdot\vec{r}$ liegt typischerweise in der Größenordnung von 10^{-3} –, ist es in vielen Fällen gerechtfertigt, die Entwicklung nach dem ersten Term abzubrechen, d.h. man setzt $e^{i\vec{k}\cdot\vec{r}} \approx 1$. Dies wird als *Dipolnäherung* bezeichnet. Der \vec{A}^2 Term im Störoperator H' kann ebenfalls vernachlässigt werden. Nützt man noch die Kommutatorbeziehung $[H_0, \vec{r}_j] = -i\frac{\hbar}{m}\vec{\nabla}_j$, so ergibt sich als Übergangswahrscheinlichkeit:

$$W_{mn} \sim \left| \vec{A}_0 \cdot \langle \psi_m | \sum_j (q_j \vec{r}_j) | \psi_n \rangle \right|^2 \quad (2.20)$$

Das Matrixelement $\langle \psi_m | \sum_j (q_j \vec{r}_j) | \psi_n \rangle$ wird als Übergangsdipolmoment bezeichnet. Aus dem Skalarprodukt zwischen dem Polarisationsvektor \vec{A}_0 und dem Übergangsdipolmoment ist ersichtlich, daß die Übergangswahrscheinlichkeit und damit die Absorption vom Kosinus des eingeschlossenen Winkels θ abhängt: $W_{mn} \sim \cos^2 \theta$. Diese Beziehung gilt auch für den Polarisationsvektor des elektrischen Feldes \vec{E}_0 , da dieser stets parallel zu \vec{A}_0 ist.

2.2.2 Absorptionsanisotropie eines orientierten uniaxialen Systems

Zur Beschreibung eines orientierten Systems von absorbierenden Molekülen ist die Anisotropie die geeignete physikalische Größe. Sie ist über die Absorptionen parallel bzw. senkrecht zur Orientierungsachse definiert:

$$r_A(\lambda) = \frac{A_{\parallel}(\lambda) - A_{\perp}(\lambda)}{A_{\parallel}(\lambda) + 2 \cdot A_{\perp}(\lambda)} \quad (2.21)$$

Da $A_{\parallel}(\lambda) + 2 \cdot A_{\perp}(\lambda) = 3A_0(\lambda)$, wobei $A_0(\lambda)$ die Absorption der Probe bei isotroper Verteilung wäre, ergibt sich aus der Definition Gl.(2.21):

$$A_{\parallel}(\lambda) = A_0(\lambda) (1 + 2r_A(\lambda)) \quad \text{und} \quad A_{\perp}(\lambda) = A_0(\lambda) (1 - r_A(\lambda)) \quad (2.22)$$

Trägt nur ein einziger elektronischer Übergang zur Absorption bei, dann sind A_{\parallel} und A_{\perp} durch den Polarwinkel θ und den Azimutalwinkel ϕ des Übergangsdipolmoments μ bezüglich der Orientierungsachse gegeben:

$$A_{\parallel}(\lambda) \sim \langle \cos^2 \theta \rangle \quad \text{und} \quad A_{\perp}(\lambda) \sim \langle \sin^2 \theta \cos^2 \phi \rangle \quad (2.23)$$

Die Mittelung ist über die axialsymmetrische Verteilungsfunktion $W(\theta)$ vorzunehmen. Da die Verteilungsfunktion unabhängig von ϕ ist, folgt unmittelbar $\langle \cos^2 \phi \rangle = 1/2$, und der Ausdruck für die (wellenlängenunabhängige) Anisotropie vereinfacht sich zu

$$r_A = \frac{\langle \cos^2 \theta \rangle - \frac{1}{2} \langle \sin^2 \theta \rangle}{\langle \cos^2 \theta \rangle + \langle \sin^2 \theta \rangle} = \langle P_2(\cos \theta) \rangle \quad (2.24)$$

Betrachtet man nun eine axialsymmetrische Verteilung von Membranen, in denen die absorbierenden Moleküle, und somit auch deren Übergangsdipolmomente, eine definierte axialsymmetrische Ordnung aufweisen, so ist $W(\theta)$ als Produkt anzusetzen:

$$W(\theta) = f(\theta') \cdot \delta(\theta'' - \theta_0) \quad (2.25)$$

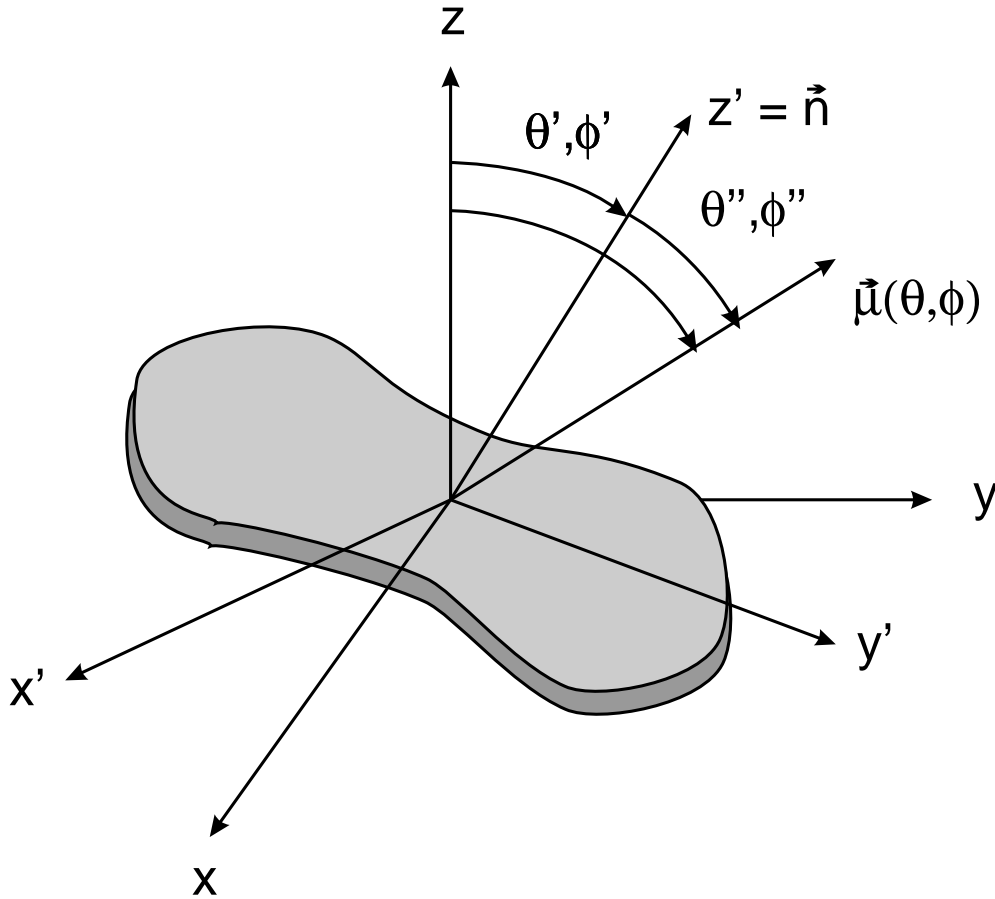


Abbildung 2.1: Darstellung der verwendeten Polarkoordinaten. Laborsystem: (x, y, z) , Membransystem: (x', y', z') , Polarkoordinaten des Übergangsdipolmomentes $\vec{\mu}$ im Laborsystem: (θ, ϕ) , Polarkoordinaten des Übergangsdipolmomentes $\vec{\mu}$ im Membransystem: (θ'', ϕ'') , Polarkoordinaten des Normalenvektors \vec{n} im Laborsystem: (θ', ϕ')

Dabei ist $f(\theta')$ die (axial symmetrische) Verteilungsfunktion der Membrannormalen \vec{n} bezüglich des Laborsystems und die Deltafunktion beschreibt die „Verteilung“ der Übergangsdipolmomente $\vec{\mu}$ im Membransystem. Die verwendeten Polarkoordinaten, bzw. die Bezugssysteme sind in Abb. 2.1 dargestellt. Alle Übergangsdipolmomente haben aber denselben Winkel (θ_0) zur Membrannormalen. Um die Mittelung in Gleichung (2.24) durchzuführen, entwickelt man $P_2(\cos \theta)$ in Kugelflächenfunktionen:

$$P_2(\cos \theta) = \frac{4\pi}{5} \sum_{m=-2}^2 Y_{2m}(\tilde{\theta}', \tilde{\phi}') Y_{2m}(\theta'', \phi'') \quad (2.26)$$

Es sei darauf hingewiesen, daß $\tilde{\theta}'$ und $\tilde{\phi}'$ die Kugelkoordinaten der Laborachse im System einer Membran sind und nicht die in Abb. 2.1 eingeführten Kugelkoordinaten einer Membrannormalen im Laborsystem θ' und ϕ' . Für die weitere Rechnung ist es aber nur von Bedeutung, daß $|\tilde{\theta}'| = |\theta'|$, während $\tilde{\phi}' \neq \phi'$ keine Rolle spielt.

Mit dem Produktansatz für die Verteilungsfunktion Gl.(2.25) und dem Additionstheorem Gl.(2.26) geht der Ausdruck für die Anisotropie über in:

$$r_A = \frac{\frac{4\pi}{5} \sum_{m=-2}^2 \int f(\theta') \cdot \delta(\theta'' - \theta_0) Y_{2m}(-\theta', \tilde{\phi}') Y_{2m}(\theta'', \phi'') d\cos \theta' d\phi' d\cos \theta'' d\phi''}{\int f(\theta') \cdot \delta(\theta'' - \theta_0) d\cos \theta' d\phi' d\cos \theta'' d\phi''} \quad (2.27)$$

Die Integration ist über alle Integrationsvariablen (θ' , ϕ' , θ'' und ϕ'') zu verstehen. Da $Y_{2m}(\theta'', \phi'') \sim e^{im\phi''}$ und $\int_0^{2\pi} e^{im\phi''} d\phi'' \equiv 0$ für $m \neq 0$, gibt es im Zähler nur für $m = 0$ einen Beitrag. Dadurch taucht auch ϕ' , das implizit in $Y_{2m}(-\theta', \tilde{\phi}')$ enthalten war, im Integranden des Zählers nicht mehr auf, und $\int d\phi' d\phi''$ kürzt sich heraus. Mit $Y_{20} = \sqrt{\frac{5}{4\pi}} P_2$ vereinfacht sich der Anisotropieausdruck Gl.(2.27) also entsprechend:

$$\begin{aligned} r_A &= \frac{\int f(\theta') P_2(-\cos \theta') d\cos \theta'}{\int f(\theta') d\cos \theta'} \cdot \frac{\int \delta(\theta'' - \theta_0) P_2(\cos \theta'') d\cos \theta''}{\int \delta(\theta'' - \theta_0) d\cos \theta''} \\ &= \frac{\langle P_2(\cos \theta') \rangle_{\theta'}}{P_2(\cos \theta_0)} \end{aligned} \quad (2.28)$$

Die Mittelung $\langle P_2(\cos \theta') \rangle_{\theta'}$ ist der Ordnungsparameter und wird mit S_2 abgekürzt. Diese Beziehung zwischen der Anisotropie und dem Polarwinkel des Übergangsdipolmoments gilt ganz allgemein für jeden definierten Chromophorzustand i :

$$r_{A_i} = S_2 P_2(\cos \theta_i) \quad (2.29)$$

2.2.3 Makroskopische Betrachtung der Lichtausbreitung im Medium

In physikalischen Experimenten ist nicht die Absorption die direkt zu beobachtende Größe, vielmehr wird die Intensitätsänderung des Lichtes nach Durchlaufen des absorbierenden Mediums detektiert. Zunächst sei ein isotropes Medium angenommen. Die Intensitätsänderung ist proportional zur Absorptionswahrscheinlichkeit W_{mn} , die in Kap. 2.2.1 hergeleitet wurde, und zur eingestrahlt Intensität $I(x)$ selbst. Man setzt daher an⁴:

$$\frac{dI(x)}{dx} \sim -2\alpha I(x) \quad (2.30)$$

Der Absorptionskoeffizient α ist proportional zu W_{mn} . Diese gewöhnliche lineare Differentialgleichung hat die folgende (einfache) Lösung:

$$I(x) = I(x=0) e^{-2\alpha x} =: I(x=0) 10^{-\varepsilon x C_M} \quad (2.31)$$

Der letztere Ausdruck ist die Formulierung des Lambert-Beerschen Gesetzes, wobei ε der molare dekadische Extinktionskoeffizient ist, und C_M die Konzentration der absorbierenden Materie in *mol/l*. Es sei erwähnt, daß zum Extinktionskoeffizienten nicht nur die Absorption beitragen kann, sondern auch Prozesse wie (elastische und quasielastische) Lichtstreuung, Raman-Streuung und Fluoreszenz Beiträge liefern. In der vorliegenden Arbeit ist aber neben der Absorption nur die Lichtstreuung von Bedeutung, die anderen Beiträge sind vernachlässigbar klein.

Geht man nun zu einem anisotropen Medium über, empfiehlt es sich, die makroskopischen Maxwell-Gleichungen zur Beschreibung der Lichtausbreitung zu Hilfe zu nehmen. Für ein nichtmagnetisches, elektrisch neutrales und nichtleitendes Medium reduzieren sich die Maxwell-Gleichungen auf die folgende Darstellung:

$$\vec{\nabla} \times \vec{E} = -\mu_0 \frac{\partial \vec{H}}{\partial t} \quad (2.32)$$

$$\vec{\nabla} \times \vec{H} = \epsilon_0 \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} + \frac{\partial \vec{P}}{\partial t} \quad (2.33)$$

⁴Aus formalen Gründen wird als Proportionalitätsfaktor 2α angesetzt, damit die Bezeichnungen im folgenden konsistent sind

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{E} = -\frac{1}{\epsilon_0} \vec{\nabla} \cdot \vec{P} \quad (2.34)$$

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{H} = 0 \quad (2.35)$$

Aus den Gleichungen (2.32) und (2.33) und $\vec{P} = \epsilon_0 \chi \vec{E}$ ergibt sich die allgemeine Wellengleichung für das elektrische Feld \vec{E} .

$$\vec{\nabla} \times (\vec{\nabla} \times \vec{E}) + \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} = -\frac{1}{c^2} \chi \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} \quad (2.36)$$

Der Suszeptibilitätstensor χ ist im Hauptachsensystem stets diagonal, mit zwei identischen Elementen, etwa $\chi_{11} = \chi_{22} =: \chi_{\perp}$, wenn die z -Achse die Symmetrieachse ist:

$$\chi = \begin{pmatrix} \chi_{\perp} & 0 & 0 \\ 0 & \chi_{\perp} & 0 \\ 0 & 0 & \chi_{\parallel} \end{pmatrix} \quad (2.37)$$

Mit dem Ansatz für eine ebene Welle $\vec{E} = \vec{E}_0 e^{i((\vec{k} + i\vec{\alpha})\vec{r} - \omega t)}$, mit $\vec{k} + i\vec{\alpha}$ wird der komplexe Ausbreitungsvektor definiert [Fow75], geht die Wellengleichung in die folgende Form über:

$$(\vec{k} + i\vec{\alpha}) \times ((\vec{k} + i\vec{\alpha}) \times \vec{E}) + \frac{\omega^2}{c^2} \vec{E} = -\frac{\omega^2}{c^2} \chi \vec{E} \quad (2.38)$$

Die allgemeinste Lösung dieser Gleichung zu finden, d.h. für eine beliebige Ausbreitungsrichtung (i.a. $\vec{k} \cdot \vec{\alpha} \neq 0$), ist offenbar nicht möglich. Aktuelle Veröffentlichungen, z.B. [Coj97], behandeln dieses Problem. Fällt die Ausbreitungsrichtung jedoch mit einer der Hauptachsen zusammen, dann ist unter bestimmten Randbedingungen $\vec{k} \parallel \vec{\alpha}$, und das Gleichungssystem vereinfacht sich drastisch. Sei $\vec{k} = (k_x, 0, 0)$ und $\vec{\alpha} = (\alpha_x, 0, 0)$, d.h. die Ausbreitungsrichtung ist senkrecht zur Symmetrieachse des Mediums, dann ergibt sich:

$$\frac{\omega^2}{c^2} E_x = -\frac{\omega^2}{c^2} \chi_{\perp} E_x \quad (2.39)$$

$$-(k_x + i\alpha_x)^2 E_y + \frac{\omega^2}{c^2} E_y = -\frac{\omega^2}{c^2} \chi_{\perp} E_y \quad (2.40)$$

$$-(k_x + i\alpha_x)^2 E_z + \frac{\omega^2}{c^2} E_z = -\frac{\omega^2}{c^2} \chi_{\parallel} E_z \quad (2.41)$$

Daraus ergeben sich zwei unabhängige Lösungen:

$$\vec{E} = (0, E_y, 0) \quad ; \quad k_x^2 - \alpha_x^2 = \frac{\omega^2}{c^2} (1 + \chi'_{\perp}) \quad ; \quad 2 k_x \alpha_x = \frac{\omega^2}{c^2} \chi''_{\perp} \quad (2.42)$$

$$\vec{E} = (0, 0, E_z) \quad ; \quad k_x^2 - \alpha_x^2 = \frac{\omega^2}{c^2} (1 + \chi'_{\parallel}) \quad ; \quad 2 k_x \alpha_x = \frac{\omega^2}{c^2} \chi''_{\parallel} \quad (2.43)$$

Im ersten Fall ist also die Welle in y -Richtung polarisiert, und der zugehörige komplexe Brechungsindex ist durch $\mathcal{N}_{\perp} = \sqrt{1 + \chi'_{\perp} + i\chi''_{\perp}}$ definiert, während im zweiten Fall Polarisation in z -Richtung vorliegt, und der zugehörige Brechungsindex durch $\mathcal{N}_{\parallel} = \sqrt{1 + \chi'_{\parallel} + i\chi''_{\parallel}}$ festgelegt wird. Für eine beliebige Polarisationsrichtung in der y, z -Ebene ist die Lichtwelle als Überlagerung von zwei ebenen Wellen zu verstehen, die einen unterschiedlichen Brechungsindex erfahren.

2.2.4 Die Kramers–Kronig–Relationen

Zur Formulierung eines Zusammenhangs zwischen der Frequenzabhängigkeit des Brechungsindex und der Absorption eines Mediums ist es zunächst zweckmäßig, die elektrische Suszeptibilität χ zu betrachten [Röm94]. Für ein Medium, dessen Eigenschaften zeitinvariant sind, ist eine lineare Abhängigkeit zwischen der elektrischen Polarisation \vec{P} und der Feldstärke \vec{E} anzusetzen, falls die Feldstärke nicht zu groß ist:

$$P_i(t) = \frac{\epsilon_0}{\sqrt{2\pi}} \sum_k \int_{-\infty}^{\infty} dt' \hat{\chi}_{ik}(t-t') E_k(t') \quad (2.44)$$

Die Suszeptibilität $\hat{\chi}_{ik}(t-t')$ ist dabei eine matrixwertige Funktion. Für die Fourier–Transformierte lautet diese Beziehung nach dem Faltungstheorem:

$$\tilde{P}_i(\omega) = \sum_k \chi_{ik}(\omega) \tilde{E}_k(\omega) \quad (2.45)$$

Die Suszeptibilität muß der Kausalitätsbedingung

$$\hat{\chi}_{ik}(t-t') = 0 \quad \text{für } t-t' < 0 \quad (2.46)$$

genügen, da $\vec{P}(t)$ nur vom Feld $\vec{E}(t')$ in der Vergangenheit $t' \leq t$ abhängen kann. Dies führt dazu, daß sogar für komplexe $z = \omega + i\eta$ das Integral

$$\chi_{ij}(z) = \frac{\epsilon_0}{\sqrt{2\pi}} \int_0^{\infty} dt \hat{\chi}_{ij}(t) e^{izt} \quad (2.47)$$

existiert und für $\eta > 0$ eine holomorphe Funktion in der oberen Halbebene darstellt. Unter der Annahme, daß die Polarisation für sehr große Frequenzen klein wird, d.h.

$$\lim_{|z| \rightarrow \infty} \chi_{ij}(z) = 0 \quad (2.48)$$

folgen aus dem Cauchyschen Integralsatz die Beziehungen zwischen dem Realteil $\chi'_{ij}(\omega)$ und dem Imaginärteil $\chi''_{ij}(\omega)$ der Suszeptibilität $\chi_{ij}(\omega)$, die **Kramers–Kronig–Relationen**:

$$\chi'_{ij}(\omega) = \frac{1}{\pi} P \int_{-\infty}^{\infty} d\omega' \frac{\chi''_{ij}(\omega')}{\omega' - \omega} \quad (2.49)$$

$$\chi''_{ij}(\omega) = -\frac{1}{\pi} P \int_{-\infty}^{\infty} d\omega' \frac{\chi'_{ij}(\omega')}{\omega' - \omega} \quad (2.50)$$

Der Hauptwert des Integrals ist dadurch definiert, daß die Integration von beiden Seiten symmetrisch an die Singularität bei $\omega = \omega'$ herangeführt wird, d.h. für eine beliebige Testfunktion $\rho(\omega)$ wäre folgende Grenzwertbildung auszuwerten:

$$P \int_{-\infty}^{\infty} d\omega' \frac{\rho(\omega')}{\omega' - \omega} = \lim_{\epsilon \rightarrow 0} \left(\int_{-\infty}^{\omega-\epsilon} d\omega' \frac{\rho(\omega')}{\omega' - \omega} + \int_{\omega+\epsilon}^{\infty} d\omega' \frac{\rho(\omega')}{\omega' - \omega} \right) \quad (2.51)$$

Für die folgenden Betrachtungen wird die Indizierung der Suszeptibilität unterdrückt, da die Richtungsabhängigkeit, d.h. die tensorielle Eigenschaft, erst wieder im Zusammenhang mit der linearen Doppelbrechung (siehe Kap. 2.2.5) von Bedeutung ist. Die Formulierung der Kramers–Kronig–Relationen in den Gleichungen (2.49,2.50) ist für die praktische Anwendung noch ungeeignet, da die Integration über negative Frequenzen ω physikalisch keinen

Sinn macht. Nützt man aus, daß $\chi^*(\omega) = \chi(-\omega)$, weil die Fourier-Transformierte $\hat{\chi}(t)$ eine reelle Größe ist, gehen die Relationen (2.49,2.50) über in die Form:

$$\chi'(\omega) = \frac{2}{\pi} P \int_0^\infty d\omega' \frac{\omega' \chi''(\omega')}{\omega'^2 - \omega^2} \quad (2.52)$$

$$\chi''(\omega) = -\frac{2\omega}{\pi} P \int_0^\infty d\omega' \frac{\chi'(\omega')}{\omega'^2 - \omega^2} \quad (2.53)$$

Der Zusammenhang von komplexem Brechungsindex $\mathcal{N} = n + i\kappa$ und Suszeptibilität lautet:

$$\mathcal{N}^2 = 1 + \chi' + i\chi'' \quad \Leftrightarrow \quad n^2 - \kappa^2 = 1 + \chi' \quad ; \quad 2n\kappa = \chi'' \quad (2.54)$$

Da der Realteil des Brechungsindex $n(\omega)$ als Absolutwert betrachtet nur wenig mit der Frequenz ω variiert, kann man in Gleichung (2.54) $n(\omega) = 1 + \delta n(\omega)$ einsetzen, wobei $\delta n(\omega)$ als Beitrag des elektronischen Übergangs zum Brechungsindex zu verstehen ist. Für ein Medium wie die Purpurmembran erwartet man sehr kleine Werte für $\delta n(\omega)$ und $\kappa(\omega)$, so daß quadratische und gemischte Terme zu vernachlässigen sind. Aus Gleichung (2.54) ergibt sich somit in guter Näherung:

$$\delta n(\omega) = \frac{\chi'}{2} \quad \text{und} \quad \kappa(\omega) = \frac{\chi''}{2} \quad (2.55)$$

Um den Zusammenhang zum Lambert-Beerschen Gesetz herzustellen, wird der Absorptionskoeffizient κ durch den molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten ε ausgedrückt:

$$\frac{\omega}{c} \kappa(\omega) = \frac{1}{2} C_M \varepsilon(\omega) \ln 10 \quad (2.56)$$

Mit $\omega = 2\pi\nu$ haben die Kramers-Kronig-Relationen nun die folgende Gestalt:

$$\delta n(\nu) = \frac{C_M \ln 10}{2\pi^2} P \int_0^\infty d\nu' \frac{\varepsilon(\nu')}{\nu'^2 - \nu^2} \quad (2.57)$$

$$\varepsilon(\nu) = -\frac{8\nu^2}{C_M \ln 10} P \int_0^\infty d\nu' \frac{\delta n(\nu')}{\nu'^2 - \nu^2} \quad (2.58)$$

Zur Kontrolle sei erwähnt, daß Gleichung (2.57) mit dem bei Kliger et al. [Kli90] verwendeten Ausdruck übereinstimmt. Für den direkten Vergleich mit dem Experiment ist noch eine weitere Umformung sinnvoll, da stets die Absorption A als Funktion der Wellenlänge λ gemessen wurde. Durch Substitution

$$\nu = \frac{c}{\lambda} \quad ; \quad d\nu = -\frac{c}{\lambda^2} d\lambda \quad ; \quad \varepsilon(\lambda) C_M = \frac{A(\lambda)}{d} \quad (2.59)$$

erhält man schließlich:

$$\delta n(\lambda) = \frac{\ln 10}{2\pi^2 d} P \int_0^\infty d\lambda' \frac{A(\lambda')}{(1 - \frac{\lambda'}{\lambda})(1 + \frac{\lambda'}{\lambda})} \quad (2.60)$$

$$A(\lambda) = -\frac{8d}{\lambda^2 \ln 10} P \int_0^\infty d\lambda' \frac{\delta n(\lambda')}{(1 - \frac{\lambda'}{\lambda})(1 + \frac{\lambda'}{\lambda})} \quad (2.61)$$

Beim Zusammenhang von komplexem Brechungsindex und Suszeptibilität in Gleichung (2.54) war der Einfachheit halber der normaldispersive Teil des Brechungsindex identisch

1 gesetzt, d.h. formal wäre δn der Beitrag zum Brechungsindex eines absorbierenden Teilchens im Vakuum. Die Behandlung in einem Medium mit Brechungsindex \bar{n} ist aber ohne weiteres möglich. Dazu wird der Zusammenhang von Brechungsindex und Suszeptibilität folgendermaßen modifiziert:

$$\bar{n}^2 (1 + \delta n + i\kappa)^2 = 1 + \chi_0 + \chi' + i\chi'' = (1 + \chi_0) \left(1 + \frac{\chi'}{1 + \chi_0} + i \frac{\chi''}{1 + \chi_0}\right) \quad (2.62)$$

An diesem Ausdruck ist abzulesen, daß $\bar{n}^2 = (1 + \chi_0)$, und in der gleichen Näherung wie oben ergibt sich

$$\delta n(\omega) = \frac{\chi'}{2\bar{n}^2} \quad \text{und} \quad \kappa(\omega) = \frac{\chi''}{2\bar{n}^2} \quad (2.63)$$

Auf die Kramers–Kronig–Relationen hat dies jedoch keine Auswirkungen, da sich \bar{n}^2 jeweils herauskürzt.

2.2.5 Lineare Doppelbrechung

In der Kristalloptik ist die Doppelbrechung ein bekanntes Phänomen, das daherrührt, daß sich der Kristall elektrisch anisotrop verhält. Die durch ein elektrisches Feld induzierte Polarisation ist im allgemeinen nicht parallel zu demselben. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit einer Lichtwelle hängt von der Ausbreitungsrichtung und der Polarisation ab. Doch nicht nur im Festkörper, sondern auch in einer (kolloidalen) Lösung (submikroskopischer Teilchen) kann unter bestimmten Bedingungen Doppelbrechung auftreten. Eine recht präzise Beschreibung solcher Effekte wurde schon 1939 von Peterlin und Stuart [Pet39] gegeben. Für axialsymmetrische Teilchen, die starr, homogen, nicht leitend und ungeladen sind, leiten sie her:

$$\Delta n = \frac{2\pi C_V}{n} (g_1 - g_2) S_2 \quad (2.64)$$

wobei $\Delta n = n_{\parallel} - n_{\perp}$, n ist der Brechungsindex der Lösung, C_V ist der Volumenanteil der Teilchen und $(g_1 - g_2)$ ist der optische Anisotropiefaktor. Die Indices 1 und 2 beziehen sich auf die Symmetrie- bzw. Querachse. S_2 , der Ordnungsparameter, oder auch Orientierungsfaktor genannt, ist als Mittelwert des zweiten Legendre–Polynoms zu verstehen:

$$S_2 = \langle P_2(\cos \vartheta) \rangle = \frac{\int P_2(\cos \vartheta) f(\vartheta) d\cos \vartheta}{\int f(\vartheta) d\cos \vartheta} \quad (2.65)$$

Dabei ist ϑ der Winkel der Symmetrieachse eines Teilchens bezüglich der Orientierungsachse (beispielsweise die Richtung eines Magnetfeldes) und $f(\vartheta)$ die zugehörige Verteilungsfunktion. Der Anisotropiefaktor $(g_1 - g_2)$ vereinfacht sich im Falle von diskförmigen Teilchen (Rotationsellipsoide, deren Symmetrieachse a_1 auf einen infinitesimal kleinen Wert schrumpft; eine vernünftige Näherung für flache Purpormembranen):

$$g_1 - g_2 = \frac{n_l^2}{4\pi n_1^2} (n_1^2 - n_2^2) - \frac{1}{4\pi n_1^2} (n_1^2 - n_l^2) (n_2^2 - n_l^2) \quad (2.66)$$

wobei n_l der Brechungsindex des Lösungsmittels ist, n_1, n_2 sind die Brechungsindices der Teilchen für parallele bzw. senkrechte Polarisation bezüglich der Symmetrieachse. Der erste Summand in Gleichung (2.66) berücksichtigt die intrinsische Anisotropie, d.h. eine Materialeigenschaft der Teilchen, während der zweite Summand die Formanisotropie beinhaltet.

Führt man $\bar{n} = (n_1 + n_2)/2$ als mittleren Brechungsindex für die Teilchen ein⁵, und verwendet die Näherung $n_1^2 \approx \bar{n}^2$, $n_2^2 \approx \bar{n}^2$, $n \approx n_l$, erhält man für die intrinsische Doppelbrechung

$$\Delta n_{intr} = C_V \frac{n_l}{\bar{n}} (n_1 - n_2) S_2 \quad (2.67)$$

und die Formdoppelbrechung

$$\Delta n_{form} = -\frac{C_V}{2n_l \bar{n}^2} (\bar{n}^2 - n_l^2)^2 S_2 \quad (2.68)$$

Im Falle von $S_2 = 1$ ist der letztere Ausdruck identisch mit der Formel von Born und Wolf [Bor59], für eine regelmäßige Anordnung von dünnen parallelen Platten bei hoher Verdünnung.

Um diese Formeln auf eine Probe von orientierten Purpurchromophoren anwenden zu können, ist noch das relative Teilchenvolumen C_V zu berechnen. Da in den Purpurchromophoren die Trimere des Proteins Bacteriorhodopsin ein zweidimensionales hexagonales Gitter bilden, erhält man mit der Dicke der Membran t , der Avogadro-Konstante N_A , der Gitterkonstanten a , der Proteinkonzentration $C_{w/v}$ (in „weight per volume“) und dem Molekulargewicht von bR M :

$$C_V = t \frac{N_A}{3} \frac{\sqrt{3}}{2} a^2 \frac{C_{w/v}}{M} \quad (2.69)$$

In der intrinsischen Doppelbrechung kann ein Beitrag auftreten, der durch anisotrope Absorption der Probe (Chromophorbeitrag) bedingt ist. Für eine uniaxiale Probe lassen sich die Kramers-Kronig-Relationen für die beiden ausgezeichneten Raumrichtungen (parallel bzw. senkrecht zur Orientierungsachse) darstellen:

$$\delta n_{\parallel}(\lambda) = \frac{\ln 10}{2\pi^2 d} P \int_0^{\infty} \frac{A_{\parallel}(\lambda')}{(1 - \frac{\lambda'}{\lambda})(1 + \frac{\lambda'}{\lambda})} d\lambda' \quad (2.70)$$

$$\delta n_{\perp}(\lambda) = \frac{\ln 10}{2\pi^2 d} P \int_0^{\infty} \frac{A_{\perp}(\lambda')}{(1 - \frac{\lambda'}{\lambda})(1 + \frac{\lambda'}{\lambda})} d\lambda' \quad (2.71)$$

Mit $A_{\parallel} - A_{\perp} = 3 A_0 r_A$, ergibt sich der Beitrag des Chromophors zur intrinsischen Doppelbrechung:

$$\Delta n_A(\lambda) = \delta n_{\parallel}(\lambda) - \delta n_{\perp}(\lambda) = \frac{3 \ln 10}{2\pi^2 d} P \int_0^{\infty} \frac{A_0(\lambda') r_A(\lambda')}{(1 - \frac{\lambda'}{\lambda})(1 + \frac{\lambda'}{\lambda})} d\lambda' \quad (2.72)$$

2.3 Die Orientierung von Membranfragmenten

Eine wichtige methodische Voraussetzung für die Experimente dieser Arbeit war die Orientierung der Purpurchromophorfragmente. Einige Verfahren, die dafür prinzipiell in Frage kommen, sollen hier kurz vorgestellt werden.

Bei bestimmten Verfahren ist die **Immobilisierung** der Membranfragmente in einer Gelmatrix erforderlich. Die Orientierung durch elektrische oder magnetische Felder kann so auch in Abwesenheit der Felder aufrecht erhalten werden. Die Gelmatrix besteht aus einem dreidimensional vernetzten Polymergerüst und einem hohen Wasseranteil. Teilchen die

⁵korrekt wäre eigentlich $\bar{n}^2 = (n_1^2 + 2n_2^2)/3$, aber die exakte physikalische Interpretation von \bar{n} ist hier nicht von Bedeutung

größer sind als die Poren der Gelmatrix werden damit effektiv immobilisiert und befinden sich aber trotzdem in einer wässrigen Umgebung. Für Purpormembranen ist ein 10% (w/v) Polyacrylamidgel (PAA) bestens geeignet. Die spektralen und funktionellen Eigenschaften von bR werden durch das PAA-Gel nicht beeinflusst [Dér85].

2.3.1 Mechanische Orientierung

Bei den mechanischen Verfahren zur Orientierung von Teilchen spielt die äußere Form der Teilchen die entscheidende Rolle. Dabei unterscheidet man im wesentlichen zwischen Stäbchen („rod-shaped“/prolat) und Scheibchen („disc-shaped“/oblat), der letzteren Klasse sind die Fragmente der Purpormembran zuzuordnen.

Disc-förmige Teilchen werden in einem **laminaren Strömungsfeld** so orientiert, daß die Normalen der Scheibchen vorzugsweise senkrecht zur Strömungsrichtung stehen. Diese Methode hat aber den Nachteil, daß sie keine Immobilisierung erlaubt.

Ein klassisches Verfahren (absorbierende) Teilchen zu orientieren ist das **Strecken/Dehnen von Polymerfilmen**, in die die Teilchen als Substrat eingelagert sind. Auf diese Weise werden Polarisationsfilter hergestellt. In der Ebene des Films erfahren jedoch nur stäbchenförmige Teilchen eine Orientierung. Disc-förmige Teilchen würden sich vorzugsweise mit den Normalen senkrecht zur Filmebene orientieren, so daß die Filme für senkrecht einfallendes Licht nahezu isotrop wären.

Derselbe Effekt einer **lamellaren Orientierung** ergibt sich, wenn sich oblate Teilchen (Membranen) auf einer ebenen Oberfläche anlagern, etwa durch Eintrocknen einer Suspension. Der Ordnungsgrad ist dabei außerordentlich hoch, der Ordnungsparameter S_2 liegt fast bei dem maximalen Wert von 1. Zwar kann senkrecht zur Orientierungsachse (Normale der Oberfläche) optisch nicht gemessen werden, doch unter schrägem Einfall zeigt sich Lineardichroismus. Mit diesem Verfahren wurde der Winkel des Übergangsdipolmomentes von bR im Grundzustand bezüglich der Membrannormalen abgeschätzt [Hey77, Lin89]. Der Ordnungsparameter der Membranen wurde dazu mittels Röntgendiffraktion bestimmt. Die Lineardichroismusmessung in dieser Geometrie (Einfallswinkel $\neq 0$) weist jedoch einige grundsätzliche Schwächen auf:

- Eine exakte formale mathematische Beschreibung ist nicht möglich⁶, da die Ausbreitungsrichtung des Lichts nicht in einer der Hauptachsen (die Orientierungsachse oder senkrecht dazu) liegt und somit keine exakte Lösung der Wellengleichung (2.36) angegeben werden kann.
- Das Ergebnis hängt recht empfindlich vom (mittleren) Brechungsindex der Teilchen ab, der für Purpormembranen nur ungenau bekannt ist ($\bar{n} \approx 1.4 - 1.55$).
- Für zeitaufgelöste Messungen ist die Geometrie besonders ungünstig, weil die Polarisation des Anregungslichtes einen komplizierten Einfluß auf die Verteilungsfunktion der angeregten Moleküle hat.
- In einer eingetrockneten Schicht sind pH-Wert und Ionenstärke schlecht einzustellen.

Eine weitere Methode ist das **Pressen von Gelen** [Abd79], in deren Poren die Membranfragmente immobilisiert sind. Die Membrannormalen orientieren sich dabei bevorzugt parallel zur Pressungsrichtung. Bezüglich der Pressungsrichtung als Orientierungsachse ergibt

⁶Korrekturen, die starke Absorption und lineare Doppelbrechung berücksichtigen, werden aber in [Nor77] behandelt

sich also ein positiver Ordnungsparameter S_2 , der nahezu 1 werden kann. Dieses Verfahren wurde von J. Kappert im Rahmen seiner Diplomarbeit in der AG Heyn [Kap96] auf PM angewendet und weiterentwickelt.

Gewissermaßen eine Umkehrung des unidirektionalen Pressens ist die Expansion des Gels in die entgegengesetzte Richtung. Dies läßt sich auch durch bidirektionales Pressen realisieren. Von diesem Prinzip inspiriert, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Methode entwickelt, die zum selben Ergebnis führt, wie das bidirektionale Pressen. Ein 10% PAA-Gel wurde zunächst vollständig **ausgetrocknet** und anschließend anisotrop **gequollen**, d.h. Expansion war nur in eine Raumrichtung zugelassen. Bezüglich der Expansionsrichtung als Orientierungsachse ergibt sich ein negativer Ordnungsparameter S_2 . Zu den experimentellen Details sei auf Kap. 3.1.3 verwiesen.

2.3.2 Orientierung im elektrischen Feld

Da Membranen häufig permanente elektrische Dipolmomente haben, ist die Orientierung im elektrischen Feld ein naheliegender Ansatz. Zusätzlich können durch das Feld auch Dipole induziert werden, die im Falle anisotroper Polarisierbarkeit ebenfalls zu einer Ausrichtung des Teilchens im Feld führen können. Die potentielle Energie eines axialsymmetrischen Teilchens mit permanentem elektrischem Dipolmoment $\vec{\mu}_e$ und den Polarisierbarkeiten entlang der Hauptachsen α_{\parallel} und α_{\perp} im elektrischen Feld der Stärke E beträgt [O’Ko59]:

$$U_{pot} = -f(E_{int}) \mu_e E \cos \theta_p - \frac{1}{2} (\alpha_{\parallel} - \alpha_{\perp}) E^2 \cos^2 \theta_i \quad (2.73)$$

wobei θ_p und θ_i die Winkel des permanenten Dipolmoments $\vec{\mu}_e$ beziehungsweise der Symmetrieachse des Polarisierbarkeitstensors α bezüglich der Feldstärke \vec{E} sind. $f(E_{int})$ ist eine Funktion des inneren Feldes und praktisch als Korrekturfaktor zu verstehen. Aus dem Ausdruck ist ersichtlich, daß permanente und induzierte Dipolmomente, je nach Feldstärke E und relativer Orientierung, entgegengesetzt wirken können. Grundlegende Ansätze zu dieser Problematik, d.h. die Berechnung der zugehörigen Verteilungsfunktion bzw. des Ordnungsparameters, finden sich z.B. bei Shah [Sha63].

Für Purpormembranen wird schon bei relativ kleinen statischen Feldstärken (DC) (ca. 20 V/cm) [Kes80] eine gute Orientierung erreicht. Die Membrannormalen orientieren sich bevorzugt in Richtung des Feldes, der Ordnungsparameter S_2 ist positiv und erreicht 1 im Maximum. Die Abhängigkeit von der Feldstärke läßt darauf schließen, daß der Beitrag der permanenten Dipole für $E \leq 30$ V/cm dominant ist und diese senkrecht zur Membranebene orientiert sind. Tragen die Membranen eine Nettoladung, was i.a. auch der Fall ist, dann wirkt auf die Membranen auch eine translatorische Kraft und es tritt Elektrophorese ein. Durch das damit verbundene Strömungsfeld werden aber die Membrannormalen aus der Richtung des elektrischen Feldes herausgekippt, und der Ordnungsgrad wird schlechter.

Auch mit Wechselfeldern lassen sich Purpormembranen orientieren [Bar83]. Bei Frequenzen von 1 bis 20 kHz erreicht der Ordnungsparameter bei etwa einer Amplitude von 300 V/cm einen Sättigungswert. Wegen der ausreichend hohen Frequenz können die permanenten Dipolmomente nicht mehr ausgerichtet werden (im zeitlichen Mittel verschwindet das zugehörige Drehmoment) und nur das induzierte Dipolmoment liefert einen Beitrag. Die Membrannormalen orientieren sich bevorzugt senkrecht zur Richtung des Feldes, d.h. es ist nur die Komponente der Polarisierbarkeit wirksam, die in der Membranebene liegt (α_{\perp}). Der Ordnungsparameter S_2 ist negativ und bestenfalls -0.5. Elektrophorese sollte bei Wechselfeldern nicht auftreten.

Eine Komplikation bei der Anwendung von elektrischen Feldern ist aber immer die Elektrolyse, d.h. an den Elektroden entsteht Wasserstoff-, bzw. Sauerstoffgas. Darunter leidet die optische Qualität der Probe (Inhomogenität, Streuzentren), und die Immobilisierung in einem PAA-Gel ist sehr schwierig, da Sauerstoff die Polymerisation verhindert.

2.3.3 Magnetische Orientierung

Da in der vorliegenden Arbeit diese Methode zur Herstellung der meisten Proben eingesetzt wurde, soll hier etwas gründlicher darauf eingegangen werden. Die Orientierung von Purpurchmembranen in einem magnetischen Feld beruht auf der anisotropen diamagnetischen Suszeptibilität, permanente magnetische Momente sind zu vernachlässigen. Es wird von der idealisierten Annahme ausgegangen, daß die Membranen vollständig eben sind. Der magnetische Suszeptibilitätstensor χ^m hat im Hauptachsensystem die gleiche Gestalt wie die elektrische Suszeptibilität (siehe Gl.(2.37)). Im Membransystem ist das Magnetfeld durch

$$\vec{H} = H \begin{pmatrix} \cos \phi \sin \theta \\ \sin \phi \sin \theta \\ \cos \theta \end{pmatrix} \quad (2.74)$$

definiert. Das induzierte magnetische Moment ist somit

$$\vec{M} = \chi^m \vec{H} = H \begin{pmatrix} \chi_{\perp}^m \cos \phi \sin \theta \\ \chi_{\perp}^m \sin \phi \sin \theta \\ \chi_{\parallel}^m \cos \theta \end{pmatrix} \quad (2.75)$$

Mit $\Delta\chi^m = \chi_{\parallel}^m - \chi_{\perp}^m$ ist das Drehmoment, das auf \vec{M} wirkt

$$\vec{D} = \vec{M} \times \vec{H} = H^2 \Delta\chi^m \sin \theta \cos \theta \begin{pmatrix} -\sin \phi \\ \cos \phi \\ 0 \end{pmatrix} \quad (2.76)$$

und die potentielle Energie einer ebenen Membran im Magnetfeld beträgt:

$$U(\theta) = \int_{\theta}^{\pi/2} \vec{D}(\theta') \cdot d\vec{\theta}' = -\frac{1}{2} H^2 \Delta\chi^m \cos^2 \theta \quad (2.77)$$

Im thermischen Gleichgewicht ergibt sich für ein Ensemble von Membranen gleicher Fläche und homogener Suszeptibilität als Verteilungsfunktion:

$$f(\theta) = \frac{e^{-\frac{U(\theta)}{kT}}}{2\pi \int_0^{\pi} e^{-\frac{U(\theta)}{kT}} \sin \theta d\theta} \quad (2.78)$$

Es hat sich gezeigt, daß für Purpurchmembranen die zur Membrannormalen parallele Komponente der magnetischen Suszeptibilität χ_{\parallel}^m größer ist als die senkrechte Komponente χ_{\perp}^m . Die Membranen orientieren sich daher bevorzugt mit den Normalen parallel zur Richtung des magnetischen Feldes, und der Ordnungsparameter $S_2 = \int P_2(\cos \theta) f(\theta) d\cos \theta$ ist positiv. Da es sich um induzierte Dipole handelt, die ausgerichtet werden, sind selbst bei perfekter Orientierung, also $S_2 = 1$, die beiden unterschiedlichen Oberflächen statistisch zur Richtung des Magnetfeldes verteilt. Das Vorzeichen vom Magnetfeld H geht nicht in die potentielle Energie ein (Gl.(2.77)), und für die Verteilungsfunktion gilt $f(\theta) = f(\pi - \theta)$. Für optische

Messungen bedeutet dies jedoch keine Einschränkung, da auch die Wellengleichung invariant unter Spiegelungen ist.

Lewis et al. [Lew85] haben durch Messung der linearen Doppelbrechung in Abhängigkeit von der Magnetfeldstärke die Anisotropie der Suszeptibilität pro bR-Molekül $\Delta\chi_{mole}^m$ bestimmt. Es wurde angenommen, daß nur das Protein selbst, genauer die Peptidbindungen der transmembranen Alpha-Helices, den maßgeblichen Beitrag liefert. Der Wert von $\Delta\chi_{mole}^m$ hängt aber empfindlich von der Größenverteilung der Membranen ab. Eine eventuelle Krümmung der Membranen wurde jedoch nicht in Betracht gezogen. Die gemessene Temperaturabhängigkeit konnte im Rahmen des Modellansatzes nicht erklärt werden.

Von Dresselhaus [Dre88] wurde beobachtet, daß die Doppelbrechung und somit die Orientierung im M-Zustand um etwa 10% kleiner ist als im bR-Grundzustand. Ob dies die Folge einer Strukturänderung ist, d.h. $\Delta\chi_{mole}^m$ ändert sich beim Übergang bR \rightarrow M, oder durch eine Formänderung der Purpurmembran (z.B. eine Krümmung) hervorgerufen wird, scheint aber unklar. Ungenauigkeiten in der Normierung können ebenfalls nicht ausgeschlossen werden.

Im Gegensatz zur Orientierung im elektrischen Feld, sind für die magnetische Orientierung enorm große Feldstärken (mindestens 10T) nötig. Solche Feldstärken werden u.a. in supraleitenden Magneten erzeugt, die normalerweise für Kernspinresonanz-Experimente verwendet werden. Da diese Geräte für das Orientieren von Proben nur begrenzt zugänglich sein können, ergeben sich gewisse Einschränkungen: Die Proben sind nicht in beliebiger Zahl verfügbar, und ein systematisches Durchtesten von verschiedenen Parametern, wie z.B. Puffer- und Salzkonzentration, ist kaum möglich.

Dagegen sind als Vorteile anzuführen, daß die Immobilisierung im PAA-Gel relativ unproblematisch ist, und vor allem die optische Qualität (Homogenität) sehr viel besser ist als bei elektrisch orientierten Proben.