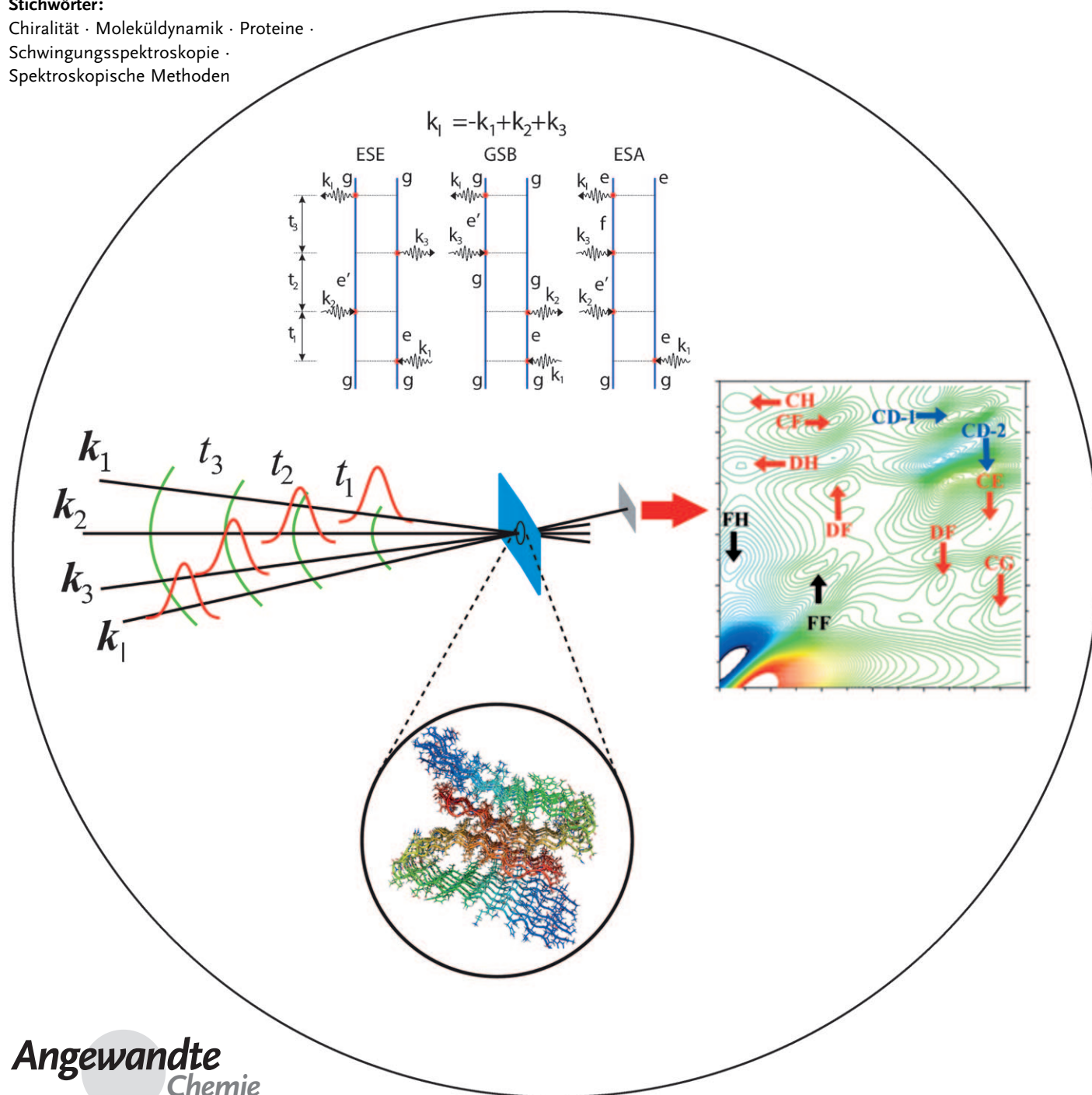


# Kohärente mehrdimensionale Schwingungsspektroskopie von Biomolekülen: Konzepte, Simulationen und Herausforderungen

Wei Zhuang, Tomoyuki Hayashi und Shaul Mukamel\*

## Stichwörter:

Chiralität · Moleküldynamik · Proteine · Schwingungsspektroskopie · Spektroskopische Methoden



**D**ie Schwingungsanregung komplexer Biomoleküle mit Femtosekunden-Infrarotpulsen ermöglicht einzigartige Einblicke in ihre Struktur, Dynamik und fluktuierende Umgebung. Dieser Aufsatz stellt die Grundlagen moderner zweidimensionaler Infrarot(2DIR)-Methoden vor, die analog sind zu den Techniken der mehrdimensionalen NMR-Spektroskopie. Störungstheoretische Ansätze zur Berechnung der nichtlinearen optischen Eigenschaften von gekoppelten lokalisierten Chromophoren werden eingeführt und auf Schwingungsübergänge im Amidrückgrat von Proteinen, flüssigem Wasser, Membranlipiden und Amyloidfibrillen angewendet. Die Signalanalyse erfolgt durch klassische Moleküldynamiksimulationen in Kombination mit einem fluktuierenden Hamilton-Operator für gekoppelte lokalisierte anharmonische Schwingungen, dessen Abhängigkeit von der lokalen elektrostatischen Umgebung durch Ab-initio-Daten parametrisiert wird. Die verwendeten Simulationsverfahren (Kumulanten-Entwicklung von Gauß-Fluktuationen, Streuung von Quasipartikeln, stochastische Liouville-Gleichungen, direkte numerische Reihenentwicklungen) sind in den SPECTRON-Code integriert, der eine Schnittstelle mit Standardmoleküldynamikmethoden hat. Ebenfalls diskutiert werden chiralitätsinduzierte Techniken zur Auflösungssteigerung sowie die Signaturen von konformativen und H-Brücken-Fluktuationen, Proteinfaltungsvorgängen und chemischen Austauschprozessen.

## 1. Einführung

Eine zentrale Aussage der Strukturbiologie besagt, dass die Strukturen und Funktionen von Biomolekülen eng miteinander verknüpft sind.<sup>[1]</sup> Die Vorhersage von Proteinstrukturen erfordert ein genaues Verständnis der Wechselwirkungen und Triebkräfte, die zur Faltung eines ungeordneten, statistisch verknäulten Zustandes zur spezifischen nativen Struktur des Proteins führen. Um Details der Faltungsmechanismen aufklären zu können, braucht es Methoden, die in der Lage sind, die Strukturen räumlich und zeitlich ausreichend aufzulösen. Die Röntgenkristallographie erzeugt statische Bilder mit atomarer Auflösung.<sup>[2]</sup> Die zeitaufgelöste Kleinwinkelstreuung liefert Gyrationenradien mit Zeitaufösungen bis in den Pikosekundenbereich.<sup>[3–6]</sup> Dreidimensionale Strukturen mit atomarer Auflösung können durch NMR-Spektroskopie<sup>[7,8]</sup> ermittelt werden, wobei die Zeitauflösung durch die Frequenz der Radiowellen begrenzt ist (Mikrosekunden).<sup>[8]</sup> Viele biophysikalische Elementarprozesse erfordern jedoch eine höhere Zeitauflösung, so etwa die Bildung von  $\alpha$ -Helices,<sup>[9]</sup> die in einigen 100 ns erfolgt. Nano- und Pikosekundenvorgänge lassen sich in manchen Fällen durch die Frequenzabhängigkeit der NMR-Relaxationskonstanten untersuchen,<sup>[10]</sup> die Messungen sind aber indirekt und ihre Interpretation ist modellabhängig. Zeitaufgelöste Röntgenbeugung liefert Pikosekunden-Aufnahmen

von Kristallstrukturen,<sup>[11]</sup> und auch ultrakurze Elektronenpulse für Anwendungen in der zeitaufgelösten Elektronenbeugung sind möglich.<sup>[12,13]</sup>

In den vergangenen Jahren hat sich die zeitaufgelöste Infrarotspektroskopie mit Laserpulsen zwischen 20 und 100 fs zu einer leistungsfähigen Methode zur Untersuchung von Proteinfaltungen entwickelt,<sup>[14]</sup> was der schnelleren Lasersteuerung einerseits und dem hinreichend lokalisierten Charakter der Schwingungsübergänge andererseits zu verdanken ist.<sup>[14–20]</sup> Die hier vorgestellten kohärenten Methoden registrieren das Ansprechverhalten von Molekülen auf Sequenzen von IR-Pulsen und liefern auf diese Weise ein mehrdimensionales Bild ihrer Strukturen. Diese mehrdimensionalen Verfahren sind analog zu entsprechenden NMR-Methoden, bieten aber eine wesentlich bessere Zeitauflösung.<sup>[21,22]</sup> Die wesentlichen Unterschiede zwischen IR- und NMR-Methoden sind in Tabelle 1 zusammengefasst.<sup>[23–25]</sup> NMR-Experimente arbeiten mit intensiven Pulsen, die mit der gesamten Spinpopulation in Wechselwirkung treten. Pulssequenzen mit Hunderten von Pulsen sind möglich. 2D-

## Aus dem Inhalt

1. Einführung	3805
2. Historische Entwicklung	3809
3. Hamilton-Operatoren für Amid-Schwingungen in Polypeptiden	3811
4. Gekoppelte lokalisierte Schwingungen im Liouville-Raum	3815
5. Spektrale Diffusion und chemischer Austausch. Die stochastischen Liouville-Gleichungen	3820
6. Die O-H-Streckschwingung von flüssigem Wasser	3822
7. Anwendungen auf Phospholipide. Quasipartikeldarstellung von 2DIR-Signalen	3825
8. Doppelquantenkohärenzspektroskopie	3828
9. Chiralitätseffekte: Verbesserung der spektralen Auflösung	3829
10. Die Struktur von Amyloidfibrillen	3831
11. Zusammenfassung und Ausblick	3833

[\*] Dr. W. Zhuang, Dr. T. Hayashi, Prof. S. Mukamel  
Department of Chemistry, University of California at Irvine  
CA 92697-2025 (USA)  
Fax: (+1) 949-824-4759  
E-Mail: smukamel@uci.edu

**Tabelle 1:** Vergleich kohärenter NMR- und IR-Methoden.

	NMR	IR
Frequenz	MHz	$10^{13}$ – $10^{14}$ Hz
Zeitauflösung	Millisekunden	Femtosekunden
Hamilton-Operator	Spin-Hamilton-Operator; wenige universelle Parameter; einfache Ableitung der Strukturen aus den Spektren	Hamilton-Operator für anharmonische Schwingungen; Berechnung der Elektronenstruktur erforderlich; viele Parameter; relativ komplizierte Ableitung der Strukturen aus den Spektren
Übergangsdipole	alle Dipole einer Atomkernsorte sind gleichsinnig ausgerichtet; gyromagnetisches Verhältnis; Polspolarisation und Spinzustände transformieren durch Rotation der Probe	variierende Dipole mit statistischer Ausrichtung; viele unabhängige Parameter für den Dipol
Pulsintensität	starke, sättigende Pulse; alle Spins werden angeregt; multiple Pulssequenzen sind möglich	schwach, nur wenige Moleküle werden angeregt; Sequenzen weniger Pulse möglich
Modellierung	Bloch-Darstellung	Suszeptibilitäten und Antwortfunktionen
Signalführung	$\lambda \gg$ Probengröße; $kr \ll 1$ ; isotropes Signal; Pfadselektion durch Phasenschleifen	$\lambda \ll$ Probengröße, $kr \gg 1$ ; stark anisotropes Signal; Pfadselektion durch räumlichen Phasenabgleich
angeregte Freiheitsgrade	Kernspins	Molekülschwingungen
Temperatur	hoch im Vergleich zur Frequenz, dadurch vereinfachte Berechnungen	niedrig im Vergleich zur Frequenz, dadurch kompliziertere Berechnungen
Phasenkontrolle der Pulse	einfach	durch Pulsformung

Infrarotstudien verwenden schwache Pulse, die lediglich einen Bruchteil der Moleküle in der Probe anregen. Anders als NMR-Pulse können multiple intensive Infrarotpulse zahlreiche photophysikalische und photochemische Prozesse auslösen, die für sich genommen interessant sind, die spektroskopische Analyse aber erschweren. In der Praxis werden deshalb nur wenige und schwache Pulse verwendet, und die Signale lassen sich aus den einkommenden Strahlungsfeldern Schritt für Schritt perturbativ berechnen. Da die Proben wesentlich größer sind als die optische Wellenlänge, ergibt sich zudem eine Richtungsabhängigkeit des Signals (Phasen Anpassung). Bei NMR-Verfahren liegt der gegenteilige Fall vor, das Signal ist hier also isotrop; eine Richtungsinformation lässt sich aber dennoch durch Phasenmodulation in den Pulsfolgen (Phasenschleifen) gewinnen. Der anharmonische effektive Hamilton-Operator, der für 2DIR-Daten benötigt wird, ist komplex und erfordert umfangreiche

Elektronenstrukturechnungen. Demgegenüber sind die für NMR-Daten verwendeten Spin-Operatoren gut bekannt, was die Simulation und Analyse der Signale erheblich vereinfacht. Im NMR-Experiment sind die Dipolmomente durch das starke Magnetfeld parallel ausgerichtet, wogegen im IR-Experiment die spezifischen Orientierungen der Dipole nützliche Strukturinformationen enthalten, die durch Variieren der Polspolarisation gewonnen werden können. NMR-Experimente bieten eine bemerkenswerte Strukturaufklärung, die von der 2DIR-Spektroskopie nicht erreicht wird. Dafür bietet die 2DIR-Spektroskopie ein zusätzliches Beobachtungsfenster mit komplementären Informationen.

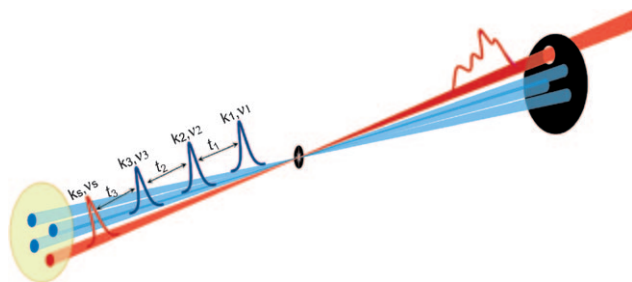
Bei einem heterodyn detektierenden 2DIR-Experiment (Abbildung 1) wechselwirken drei Laserpulse mit den Wellenvektoren  $\mathbf{k}_1$ ,  $\mathbf{k}_2$  und  $\mathbf{k}_3$  (in chronologischer Reihenfolge) mit einem Peptid. Das kohärente Signalfeld wird entlang einer der phasenangepassten Richtungen  $\mathbf{k}_s = \pm \mathbf{k}_1 \pm \mathbf{k}_2 \pm \mathbf{k}_3$



Wei Zhuang studierte Chemie an der University of California in Irvine und absolviert zurzeit ein Postdoktorat an der UC in Berkeley.



Tomoyuki Hayashi wurde 1973 in Tokio geboren. Er promovierte 2002 bei Prof. Hiro-o Hamaguchi und war bis 2008 Assistenzwissenschaftler an der University of California in Irvine. Zurzeit beschäftigt er sich in der Arbeitsgruppe von Prof. Alexei Stuchebrukhov an der UC in Davis mit dem Elektronentransfer in Proteinen.



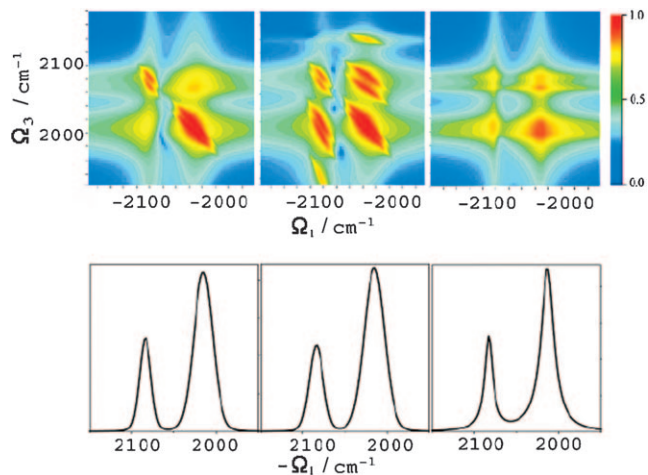
**Abbildung 1.** Pulsanordnung eines heterodyn detektierenden mehrdimensionalen Vier-Wellen-Mischungsexperiments. Die Signale werden auf der Achse der drei Zeitintervalle  $t_1$ ,  $t_2$  und  $t_3$  aufgenommen und in 2D-Korrelationsdiagrammen von zweien der Zeitintervalle bei konstantem dritten Zeitintervall dargestellt [siehe Gl. (14) in Abschnitt 4].

erzeugt, wobei alle Moleküle phasengleich emittieren und durch einen vierten Puls („lokaler Oszillator“) mit dem gewünschten Wellenvektor  $\mathbf{k}_s$  abgefragt werden. Das Signal  $S(t_3, t_2, t_1)$  ergibt sich aus der Intensitätsänderung des Feldes des lokalen Oszillators bei Wechselwirkung mit den anderen Feldern. Die parametrische Abhängigkeit des Signals von den Zeitintervallen zwischen den Pulsen birgt eine Fülle von Informationen. Normalerweise werden 2DIR-Signale in Form zweidimensionaler Auftragungen der Intensität über die Zeitintervalle der Pulsfolgen (z. B.  $t_1$  und  $t_3$ ) dargestellt, wobei die dritte Variable (hier  $t_2$ ) konstant gehalten wird. Da die Signale in dieser Darstellung stark oszillieren, wird eine doppelte Fourier-Transformation in Bezug auf die beiden Zeitvariablen vorgenommen, die eine Frequenz-Frequenz-Korrelation  $S(\Omega_1, t_2, \Omega_3)$  liefert, wobei  $\Omega_1$  und  $\Omega_3$  die konjugierten Frequenzen von  $t_1$  und  $t_3$  sind (Abbildung 1).

Die Methode der heterodynen Detektion gestattet die Aufzeichnung des gesamten Signalfeldes (d. h. Amplitude und Phase), sodass sowohl der Realteil (phasengleich) als auch der Imaginärteil (phasenverschoben) dargestellt werden können. Gekoppelte Schwingungsmoden erzeugen neue Resonanzen (Kreuzkorrelationen), deren Intensitäten und Zeitprofile direkte Signaturen für die Korrelationen zwischen den Schwingungsübergängen liefern. Die Signaturen sind hintergrundfrei und verschwinden bei nicht-koppelnden Schwingungen. Korrelationsdiagramme von dynamischen Ereignissen, die sich innerhalb kontrollierter Entwicklungsperioden abspielen, können durch Mehrpunkt-Korrelationsfunktionen beschrieben werden. Diese Funktionen enthalten wesentlich mehr Informationen als die Zwei-Punkt-Funktion

nen der linearen Spektroskopie und erlauben so die Differenzierung zwischen verschiedenen möglichen Modellen, deren 1D-Spektren praktisch identisch sind.

In Abbildung 2 sind simulierte 2D-Photonenechospektren zweier gekoppelter Schwingungen dargestellt. Die Diagonalsignale bei  $(-2000, 2000)$  und  $(-2100, 2100)$  spiegeln die lineare Absorption wider, während die Kreuzsignale bei



**Abbildung 2.** Oben: 2D-Photonenechospektrum zweier gekoppelter Schwingungen in der phasenanpassenden Richtung  $\mathbf{k}_l = -\mathbf{k}_1 + \mathbf{k}_2 + \mathbf{k}_3$ .  $\Omega_1$  und  $\Omega_3$  sind die konjugierten Fourier-Variablen von  $t_1$  und  $t_3$ . Die Frequenzfluktuationen der beiden Moden sind in der linken Tafel langsam und antikorreliert, in der mittleren Tafel langsam und korreliert und in der rechten Tafel schnell und antikorreliert. (Entnommen aus Lit. [27].) Unten: die entsprechenden linearen Absorptionen für die drei gezeigten Fälle.

$(-2000, 2100)$  und  $(-2100, 2000)$  die Kopplung zwischen den beiden Moden abbilden. Die Form der 2D-Signale hängt sehr empfindlich von der Zeitskala und dem Grad der Korrelation der Frequenzfluktuationen ab und vermittelt dadurch wertvolle Informationen über die fluktuierende Umgebung. Schnelle Fluktuationen (rechte Tafel) ergeben runde Signale (homogene Verbreiterung), während langsamere Perturbationen (linke Tafel) zu verlängerten Signalformen führen. Ein Vergleich der linken und mittleren Tafel verdeutlicht die starke Modulation der Kreuzsignale mit dem Ausmaß der Korrelation. Eine Signalformanalyse der 2D-Photonenechos von Solut-Solvens-Komplexen ergab, dass sich die langsamere von zwei Zeitkomponenten im Lösungsmittelgemisch auf einer längeren Zeitskala entwickelte als in den reinen Lösungsmitteln, was Änderungen in der Zusammensetzung der inneren Solvathülle zugeschrieben wurde.<sup>[26]</sup> Derartige Detailinformationen sind mit 1D-Experimenten nicht zugänglich.

Die Pump-Probe-Spektroskopie (auch Transientenabsorptionspektroskopie) ist die konzeptionell und technologisch einfachste nichtlineare Spektroskopiemethodik, da sie nur zwei Laserpulse benötigt, nämlich den Anregungs- („Pump“) und den Abfragepuls („Probe“), und keine Phasenkontrolle erfordert. Üblicherweise sind die beiden Pulse zeitlich deutlich separiert. Das System wechselwirkt zunächst mit dem Anregungspuls und dann mit dem Abfragepuls. Der Transmissionsunterschied, der mit und ohne Anregungspuls



Shaul Mukamel ist Professor für Chemie an der University of California in Irvine und Autor von über 600 Veröffentlichungen, einschließlich des Lehrbuchs *Principles of Nonlinear Optical Spectroscopy*. Seine Forschungen gelten der Entwicklung von Laserpulssequenzen zur Untersuchung molekularer Strukturen und Fluktuationen sowie von Energie- und Ladungstransferprozessen.



erhalten wird, liefert Informationen über die Strukturänderungen und den Energietransport im Zeitraum zwischen den Pulsen. Eine ebenfalls weit verbreitete Technik ist die Photonenecho-Spektroskopie, die ein in der Richtung  $\mathbf{k}_s = -\mathbf{k}_1 + \mathbf{k}_2 + \mathbf{k}_3$  erzeugtes Photonenechosignal detektiert.<sup>[28]</sup> Die während  $t_1$  und  $t_3$  im Molekül erzeugten Anregungen haben entgegengesetzte Phasen, wodurch inhomogene Signalverbreiterungen exakt aufgehoben und Einblicke in Bewegungsabläufe und Relaxationsprozesse möglich werden, die durch 1D-Methoden nicht zugänglich sind. Auch Experimente mit längeren Pulsen, die IR- und Raman-Techniken kombinieren, wurden realisiert.<sup>[29]</sup>

2D-Techniken wurden in vielen Feldern der Physik, physikalischen Chemie und physikalischen Biologie angewendet, z. B. zur Untersuchung der Gleichgewichtsstrukturen von Biomolekülen, der Dynamik von Peptidfaltungen, der Struktur und Dynamik von Wasserstoffbrücken in flüssigem Wasser, der elektrostatischen Umgebung von Chromophoren oder von Schwingungsenergietransferpfaden. Ein kurzer Überblick über diese Anwendungen wird in Abschnitt 2 gegeben.

Die Dynamik von Peptidfaltungen (im Piko- bis Nanosekundenbereich) wurde durch Monte-Carlo(MC)- und Moleküldynamik(MD)-Simulationen intensiv untersucht.<sup>[30–37]</sup> Einfache Gittermodelle<sup>[35,36]</sup> helfen vor allem, die grundlegenden physikalischen Prinzipien des Faltungsprozesses zu verstehen, während All-Atom-MD-Simulationen<sup>[32,37]</sup> dazu dienen, realistischere Informationen über die Struktur und Dynamik zu gewinnen. Derzeit verfügbare Rechenleistungen limitieren solche Verfahren auf Trajektorien von einigen Dutzend Nanosekunden. Eine 1998 erschienene MD-Studie beschrieb die Proteinfaltung unter expliziter Einbeziehung von Wasser auf einer Zeitskala von 1 Mikrosekunde.<sup>[38]</sup> Der Rechenaufwand für die direkte Simulation einer Proteinfaltung ist normalerweise zu hoch.<sup>[39–41]</sup> Für Peptide und kleine Proteine ist die Aufklärung des Faltungsmechanismus dank fortwährender Verbesserung der MD-Verfahren aber schon in greifbare Nähe gerückt. Sehr hilfreich war die Entwicklung einfacher Modellpeptide, die die Komplexität von Proteinen gut wiedergeben, aber doch ausreichend klein für detaillierte Simulationen sind,<sup>[33,40,42–44]</sup> und die Entwicklung und Implementierung leistungsfähiger Simulationsalgorithmen<sup>[45]</sup> mit verbesserter Berücksichtigung seltener Ereignisse.<sup>[46,47]</sup> Da die Visualisierung der Faltungsprozesse wesentlich auf Simulationen beruht, ist es erstrebenswert, Experimente auf Zeitskalen durchzuführen, die auch Computersimulationen zugänglich sind. 2DIR-Experimente und atomistische MD-Simulationen können auf der gleichen Zeitskala ausgeführt werden, sodass MD-Protokolle zur Simulation von 2DIR-Signalen bei der Spektreninterpretation und der Zuordnung der Molekülbewegungen helfen können. Zugleich kann die Güte von MD-Kraftfeldern durch Vergleich der vorherberechneten 2DIR-Spektren mit dem Experiment überprüft werden.

In diesem Aufsatz stellen wir den Stand der Technik bei Rechenverfahren zur Simulation der 2DIR-Signale von Biomolekülen dar.<sup>[48–55]</sup> Die Amid-Schwingungen von Peptiden<sup>[55–57]</sup> lassen sich durch das Excitonen-Modell von Frenkel beschreiben, das ursprünglich für gekoppelte lokale Umwandlungen in Oligomeren oder Polymeren aus ähnlichen

Wiederholungseinheiten entwickelt wurde. Die benötigten Parameter lassen sich aus Elektronenstrukturechnungen der individuellen Chromophore anstatt des gesamten Systems erhalten, was den Rechenaufwand erheblich reduziert. Ein typisches Spektrum besteht dann aus deutlich separierten Energieniveaus, die Einzel-, Doppel- und höheren Anregungen entsprechen. Der molekulare Hamilton-Operator konserviert die Zahl der Anregungen, die somit nur durch die optischen Felder verändert werden können. Der niedrigste Zustand („single-exciton“) ist durch lineare optische Techniken wie Absorption und Circular dichroismus zugänglich, während zweifache („two-exciton“) und höhere Anregungszustände nichtlineare Spektroskopietechniken erfordern. Ein Hamilton-Operator für fluktuierende Excitonen von Peptiden wird in Abschnitt 3 vorgestellt. In Abschnitt 4 führen wir den Ansatz der Antwortfunktionen als eine Möglichkeit zur Signalsimulation ein. Die Modellierung kohärenter Schwingungssignale umfasst die folgenden Schritte:

1. Aus MD-Trajektorien auf der Grundlage existierender Kraftfeldmethoden wie CHARMM,<sup>[58]</sup> GROMOS<sup>[59]</sup> und AMBER<sup>[60]</sup> werden Protein- und Solvenskonfigurationen generiert.
2. Für jede Konfiguration wird ein fluktuierender anharmonischer effektiver Hamilton-Operator der Schwingungsexcitonen,  $\hat{H}_S(t)$ , und die Übergangsdipolmatrix  $\boldsymbol{\mu}(t)$  der relevanten Zustände konstruiert, wobei der Hamilton-Operator ein höheres Theorieniveau haben muss als die in Schritt (1) verwendeten Kraftfelder.
3. Vier-Punkt-Korrelationsfunktionen für die Übergangsmomente werden berechnet, die die relevanten Molekülbewegungen und Fluktuationen beschreiben.<sup>[61]</sup>
4. Die Antwortfunktionen werden durch spezifische Kombinationen der Vier-Punkt-Korrelationsfunktionen berechnet, welche die für die gewählte Methode im Quanten-Liouville-Raum relevanten Pfade beschreiben.

Der Schritt 1 ist gut entwickelt und dokumentiert, wobei auf ein großes Arsenal von Algorithmen und Programmpaketen zurückgegriffen werden kann. Wir konzentrieren unsere Diskussion deshalb auf die Schritte 2–4. In Abschnitt 2 geben wir eine kurze Übersicht über die historische Entwicklung der kohärenten mehrdimensionalen Spektroskopie und fassen dann in Abschnitt 3 die Methoden zur Konstruktion effektiver Hamilton-Operatoren für fluktuierende Excitonen der peptidischen Amidbanden zusammen. In Abschnitt 4 führen wir das theoretische Gerüst ein, das für die Modellierung nichtlinearer optischer Signale benötigt wird, wobei unter anderem ein einfaches, exakt lösbares Gaußsches Fluktuationsmodell diskutiert wird. In diesem zustandsummierenden Ansatz („sum-over-state“, SOS)<sup>[62]</sup> induziert das optische Feld Übergänge zwischen den Eigenzuständen des Systems, und die Nichtlinearität des Antwortsignals wird der Anharmonizität des Systems zugeordnet (da harmonische Schwingungen linear sind, verschwindet ihre nichtlineare Antwort durch Interferenzen zwischen den Quantenpfaden). Der SOS-Ansatz ist für kleine Peptide geeignet (z. B. zur Analyse der Amid-I-Banden von Peptiden mit weniger als 30 Aminosäuren). Die Verwendung stochastischer Liouville-Gleichungen zur Beschreibung des chemi-

schen Austauschs und der spektralen Diffusion durch Einbeziehung externer kollektiver Badkoordinaten wird in Abschnitt 5 vorgestellt. In Abschnitt 6 werden Anwendungen auf die Dynamik der Wasserstoffbrücken von HDO in D<sub>2</sub>O beschrieben. Eine für größere Biomoleküle wie globuläre Proteine oder Membransysteme geeignete Methodik<sup>[48,62,63]</sup> wird in Abschnitt 7 diskutiert; hierbei resultiert das Signal aus der Streuung von Einzelanregungen (Quasipartikeln) anstatt aus Übergängen zwischen Zuständen. Die benötigten Quasipartikel-Funktionen lassen sich aus Bewegungsgleichungen herleiten (Gleichungen für nichtlineare Excitonen; NEEs).<sup>[64]</sup> In Abschnitt 8 zeigen wir, wie eine geschickte Wahl des Wellenvektors der Signale zur Untersuchungen von Doppelanregungen (doppelte Quantenkohärenz) genutzt werden kann, die alternative Einblicke in die Struktur liefern können. Chiralitätsinduzierte Verfahren – als 2D-analoge Form des Circular dichroismus – werden in Abschnitt 9 besprochen. Bei diesen Ansätzen wird die Auflösung von 2DIR-Signalen erhöht, indem man sich die Chiralität von Peptiden zunutze macht. Die Toxizität von Amyloidfibrillen, Aggregaten fehlgefalteter Peptide, die mit verschiedenen Krankheiten wie der Alzheimer-Demenz in Verbindung stehen, hängt stark von ihrer Struktur ab. Die in Abschnitt 10 vorgestellten 2DIR-Simulationen bieten sich als vielversprechende Methoden für die Gewinnung von Strukturinformationen an, die mit anderen Verfahren nicht zugänglich sind. Den Abschluss bildet Abschnitt 11 mit einer Zusammenfassung und einem Ausblick.

## 2. Historische Entwicklung

Die Infrarotabsorption liefert eine eindimensionale (1D) Projektion molekularer Eigenschaften auf die Frequenzachse, hervorgerufen durch eine lineare Polarisierung der Probe im Strahlungsfeld. Zur Untersuchung von Polarisierungen höherer Ordnung und komplexeren Vorgängen stehen nichtlineare Spektroskopietechniken zur Verfügung. Inkohärente Techniken<sup>[65,66]</sup> wie Fluoreszenz-, Raman- und Pump-Probe-Verfahren operieren unabhängig von den Phasen der Laserpulse, wohingegen kohärente Techniken generell phasenabhängig sind. Die Modellierung nichtlinearer Spektren wird erheblich vereinfacht, wenn die Frequenzfluktuationen ( $\Lambda$ ) entweder viel schneller oder viel langsamer relaxieren als ihre Magnituden ( $\Delta$ ). Die Relaxationsgeschwindigkeiten können dann phänomenologisch als homogene ( $\Delta/\Lambda \ll 1$ ) oder inhomogene ( $\Delta/\Lambda \gg 1$ ) Verbreiterungen eingeführt werden. In den 70er Jahren nahm man an, mit elektronisch nicht-resonanten CARS-Messungen (kohärente Anti-Stokes-Raman-Spektroskopie) der Schwingungsphasenentkopplung zwischen den beiden Verbreiterungsmechanismen unterscheiden zu können,<sup>[67,68]</sup> ähnlich wie mit der Photonenechotechnik.<sup>[69]</sup> Durch Formulierung des Problems in Mehrpunkt-Korrelationsfunktionen der elektrischen Polarisierbarkeit konnten Loring und Mukamel<sup>[70]</sup> aber zeigen, dass dies nicht der Fall ist. Wesentlich ist in diesem Zusammenhang, dass die optischen Signale bezüglich ihrer Dimensionalität (d.h. der Zahl der extern kontrollierbaren Zeitintervalle) und nicht bezüglich der Ordnung des nichtlinearen Feldes klassifiziert werden

sollten. Sowohl die Photonenechosignale als auch die elektronisch nicht-resonanten zeitaufgelösten CARS-Signale sind dritter Ordnung bezüglich der externen Felder. CARS hat jedoch nur eine frei steuerbare Zeitvariable,  $t_2$  (siehe Abbildung 1). Die beiden anderen Zeiten,  $t_1$  und  $t_3$ , sind aufgrund der Heisenbergschen Unschärferelation für einen nicht-resonanten Übergang sehr kurz und tragen keine molekulare Information. Die Technik ist daher eindimensional und vermittelt den gleichen Informationsgehalt wie die spontane Raman-Spektroskopie. Sie vermag deshalb nicht zwischen homogenen und inhomogenen Linienformen zu unterscheiden. Aus dieser Analyse folgt auch, dass eine zur Photonenechotechnik analoge 2D-Raman-Spektroskopie sieben anstelle von nur drei Pulsen erfordern würde. Solche Experimente wurden realisiert.<sup>[71–73]</sup> Geschlossene Ausdrücke für Mehrpunkt-Korrelationsfunktionen von Multiniveausystemen, deren Frequenzen stochastischen Gauß-Fluktuationen unterliegen,<sup>[74,75]</sup> bereiteten den Weg für mehrdimensionale Simulationen derartiger Spektren.<sup>[76]</sup> Tanimura und Mukamel<sup>[77]</sup> schlugen eine einfachere, impulsive und nicht-resonante Raman-Technik mit nur fünf Pulsen vor, die, analog zur mehrdimensionalen NMR-Spektroskopie, mittels zweidimensionaler Frequenz-Frequenz-Darstellungen interpretiert werden kann. Messungen niederfrequenter intermolekularer Schwingungen ( $\approx 300\text{ cm}^{-1}$ ) in flüssigem CS<sub>2</sub><sup>[78–87]</sup> waren zunächst durch Kaskadeneffekte (Sequenzen von Prozessen dritter Ordnung) beeinträchtigt, die aber später vermieden werden konnten.<sup>[88]</sup> Auch Experimente in flüssigem Formamid wurden beschrieben.<sup>[89]</sup> Das gleiche Konzept wurde später<sup>[48,65,90]</sup> auf Schwingungsübergänge im Infrarotbereich<sup>[57,91–93]</sup> und auf die Elektronenspektroskopie im Sichtbaren<sup>[94–97]</sup> übertragen. Infrarottechniken erfordern weniger Laserpulse als Raman-Techniken, weil jeder Übergang nur ein einzelnes Feld anstatt deren zwei einbezieht. Die nötige Steuerung der Laserpulsphasen, die bei Radiowellen relativ einfach ist, stellt bei höheren Frequenzen eine beträchtliche Herausforderung dar.

Das erste 2D-Frequenz-Frequenz-Experiment geht auf Hamm und Hochstrasser zurück,<sup>[98]</sup> die eine Pump-Probe-Technik mit zwei Infrarotpulsen, einem schmalen ( $\approx 10\text{ cm}^{-1}$ ) Pump- und einem breiteren Abfragepuls ( $130\text{ cm}^{-1}$ ), einsetzten. Das Antwortsignal wurde spektral aufgelöst und als Funktion seiner Frequenz und der des Pumpimpulses aufgezeichnet. Diese Studie konnte erstmals zeigen, wie die 2DIR-Kreuzsignale zur Aufklärung der Strukturen kleiner Peptide genutzt werden können.<sup>[99]</sup> Die Diagonalsignale geben die Energien der lokalisierten C=O-Moden wieder, während die Kreuzsignale die von der Peptidstruktur abhängigen Kopplungen zwischen den Moden beschreiben. Aus den Intensitäten und Anisotropien der Kreuzsignale konnte mithilfe eines einfachen Modells für die Kopplungsmuster die 3D-Struktur eines cyclischen Peptids bestimmt werden.

Eine quantitative Analyse erfordert Hamilton-Operatoren von hoher Güte, die für kleinere Peptide entwickelt worden sind. Die Rückgratstruktur von Trialanin in wässriger Lösung wurde durch 2D-Spektroskopie der Amid-I-Bande mit polarisiertem Licht untersucht.<sup>[100]</sup> Das stimulierte Photonenecho von *N*-Methylacetamid (NMA),<sup>[101]</sup> einem molekularen Modell für eine einzelne Amideinheit, wurde ge-

messen und zur Bestimmung der Schwingungsfrequenzkorrelationsfunktion genutzt. Diese Ergebnisse werden oft als Referenz für effektive Hamilton-Operatoren verwendet. Experimente an Polypeptiden werden häufig als Referenz für Kopplungen und Übergangsdipole herangezogen. In einer Arbeit aus 2004 wurden 2DIR-Spektren einer Serie von doppelt isotoptenmarkierten  $\alpha$ -Helices mit 25 Untereinheiten beschrieben. Durch  $^{13}\text{C}$ - und  $^{18}\text{O}$ -Markierung von Untereinheiten der Helix konnten die Kopplungen zwischen unterschiedlichen Amid-I-Moden, die durch ein, zwei oder drei Aminosäuren voneinander getrennt waren, gemessen werden.<sup>[102]</sup> Zwei ähnliche Studien einer  $\beta$ -Haarnadelstruktur<sup>[56]</sup> sowie einer  $3_{10}$ -Helix und eines weiteren Typs von  $\alpha$ -helicalen Peptiden<sup>[103]</sup> wurden beschrieben. Auch andere kleine Moleküle wurden untersucht, wie DNA<sup>[104]</sup> und ein Rotaxan.<sup>[105]</sup>

Die erfolgreiche Anwendung dieser 2DIR-Methoden auf kleine Peptide hat fast zwangsläufig zu Studien größerer Systeme angeregt. Durch Vergleich globulärer Proteine mit unterschiedlichem Anteil an  $\beta$ -Faltblattmotiven konnte Tokmakoff et al. eine für  $\beta$ -Faltblätter charakteristische „Z“-Form im Photonenechospektrum ausmachen.<sup>[57]</sup>  $\alpha$ -Helices ergeben hingegen eine ungeordnete Signalstruktur, und die zufälligen Ausrichtungen der Unterstrukturen führen zu unstrukturierten, diagonal elongierten Banden.<sup>[106]</sup> Righini und Mitarbeiter untersuchten die lokale Struktur von Lipiden in Dimyristoylphosphatidylcholin(DMPC)-Membranen durch Isotoptenmarkierung der Carbonylgruppen der Membran.<sup>[107,108]</sup> Durch Signalformanalyse der 2D-Spektren der Amid-I-Banden (Streckschwingung der Rückgrat-Carbonylgruppen) von elf entlang eines Transmembranpeptidbündels ausgerichteten Aminosäureresten konnten Zanni et al. die homogenen und inhomogenen Signalverbreiterungen bestimmen, die Auskunft über die Strukturverteilungen und die Pikosekundendynamik von Peptiden und deren Umgebung geben.<sup>[93]</sup> Auch 2DIR-Studien fehlgefalteter Peptidaggregate (Amyloidfibrillen) wurden beschrieben.<sup>[109–111]</sup>

Durch die zeitaufgelöste Verfolgung der Änderungen der Kreuzsignale im Piko- und Nanosekundenbereich<sup>[112]</sup> untersuchten Hamm und Mitarbeiter die durch eine UV-induzierte Spaltung einer Disulfidbrücke zwischen dem ersten und dritten Glied ausgelöste Entfaltung eines Tetrapeptids.<sup>[22,92]</sup> Die Kreuzsignale geben Auskunft über die Dynamik der Wasserstoffbrücken auf einer Zeitskala von wenigen Pikosekunden. Tokmakoff untersuchte durch 2DIR der Amid-I-Bande die statischen und transienten Konformationsänderungen bei der thermischen Entfaltung von Ubiquitin.<sup>[113]</sup> Die Gleichgewichtsmessungen deuten auf eine einfache, zweistufige Entfaltung hin, während die Transientenexperimente ein komplexes Relaxationsverhalten der verschiedenen spektralen Komponenten aufzeigen, dessen Zeitskala sechs Größenordnungen überspannt. Durch zeitaufgelöste IR-Spektroskopie konnten Hamm et al. die stark temperaturabhängige, nichtexponentielle Spektrokinetik der Faltung und Entfaltung eines photoschaltbaren  $\alpha$ -helicalen Peptids auf Alanin-Basis mit 16 Untereinheiten von einigen Pikosekunden bis beinahe 40  $\mu\text{s}$  im Temperaturbereich von 279–318 K verfolgen.<sup>[114]</sup> Beide Prozesse zeigen ein komplexes, gestreckt-exponentielles Antwortsignal, das auf eine breite

Geschwindigkeitsverteilung hinweist. Mithilfe eines Elektronenlasers wurden Umgebungseffekte auf die IR-Schwingungsdynamik von Wolframhexacarbonyl in kryogenen Matrices durch Bestimmung der Populationsrelaxationszeit  $T_1$  durch Pump-Probe-Experimente und der Phasenentkopplungszeit  $T_2$  in einem Zweiphotonenecho untersucht.<sup>[115]</sup> Schnelle (einige ps) IR-Photonenecho-Spektren des aktiven Zentrums von Formiatdehydrogenase (FDH) im Komplex mit Azid ( $\text{N}_3^-$ , ein als Übergangsstruktur analogon fungierender nanomolarer Inhibitor) und Nicotinamid ( $\text{NAD}^+$ ) zeigen das Vorliegen einer raschen Dynamik in der Nähe des katalytischen Übergangszustandes.<sup>[116]</sup> Harris und Mitarbeiter zeigten, dass durch 2DIR-spektroskopische Verfolgung der Schwingungsmoden direkte Informationen über die Geometrie des Übergangszustandes, die Zeitskala und den Reaktionsmechanismus der fluktuierenden Umlagerung von  $[\text{Fe}(\text{CO})_5]$  gewonnen werden können.<sup>[117]</sup>

Ultraschnelle IR-Raman-Spektroskopie (Pumpimpuls im mittleren IR, Raman-Abfragepuls) wurde erfolgreich zur Untersuchung des schnellen Energietransfers in flüssigem Wasser und Methanol und von HOD in  $\text{D}_2\text{O}$  angewendet.<sup>[118,119]</sup> Die Struktur und Dynamik der Wasserstoffbrücken in flüssigem Wasser wurden durch 2DIR-Spektroskopie intensiv untersucht. Tokmakoff und Mitarbeiter studierten die Umlagerung des H-Brücken-Netzwerks durch Messung der Fluktuationen der O-H-Streckschwingung von HOD in flüssigem  $\text{D}_2\text{O}$ ; die Frequenzfluktuationen hängen direkt mit der intermolekularen Dynamik zusammen. Modellierungen ergeben, dass die Verschiebung der O-H-Frequenz aus Änderungen des auf die Protonen wirkenden elektrischen Feldes beruht. Bei kurzen Zeiten entspricht die Schwingungskopplung einer gedämpften Schwingung der Wasserstoffbrücken mit einer Periode von 170 fs. Bei längerer Zeitskala wird ein Abklingen der Schwingungskorrelationen mit einer Konstante von 1.2 ps aufgrund von kollektiven strukturellen Reorganisationen beobachtet.<sup>[120]</sup> Mit einer Kombination von 2DIR- und MD-Verfahren wurde die Stabilität von Spezies, die keine Wasserstoffbrücken bilden, in einer isotoptenverdünnten Mischung von HOD in  $\text{D}_2\text{O}$  untersucht, wobei sich die Konfigurationen mit und ohne H-Brücken hinsichtlich ihres Relaxationsverhalten qualitativ unterschieden.<sup>[121]</sup> Moleküldynamische Elektronenstrukturechnungen wurden zur Bestimmung der Zeitkorrelationsfunktionen (TCFs; time correlation functions) zweier Kraftfelder für Wasser (TIP4P und SPC/E) genutzt.<sup>[122]</sup> Die TCFs dienen als Eingabeparameter für die Simulation von 2DIR-Spektren. Vergleiche mit experimentellen Daten zeigen, dass beide Kraftfelder die schnellen Fluktuationen (300–400 fs) überbewerten und die langsamsten Fluktuationen (1.8 ps) nicht berücksichtigen. Die Schwingungsechokorrelationsspektren sind ein Gütekriterium für die TCFs. Die Temperaturabhängigkeit des Photonenechos der O-H-Schwingung in flüssigem  $\text{H}_2\text{O}$  zeigte, dass sich der Zeitraum der Frequenzkorrelation (und damit auch der Strukturkorrelation) beim Abkühlen von 297 auf 274 K von 50 fs auf 200 fs ausdehnt, was auf eine Verminderung der Phasenentkopplung durch Librationsmoden hindeutet.<sup>[123]</sup> Auch einfache Anionen ( $\text{CN}^-$ ,  $\text{N}_3^-$ ) wurden als Sonden für die Fluktuation von H-Brücken-Netzwerken genutzt.<sup>[124–126]</sup>

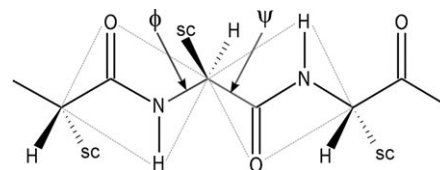
Elektrostatische Wechselwirkungen sind von großer Bedeutung für Enzymaktivitäten und für die Entwicklung von Wirkstoffen. Da die nichtkovalente elektrostatische Koordination von Cofaktoren hinreichend schwach ist, um reversibel zu sein,<sup>[127,128]</sup> sollte die 2DIR-Spektroskopie eine Möglichkeit zur direkten Beobachtung der elektrostatischen Umgebung und ihrer Fluktuationen bieten. Artifiziale Chromophore, z. B. Nitrile, lassen sich an bestimmten Stellen in der aktiven Region einführen.<sup>[129]</sup> Eine 2DIR-Studie eines Wirkstoffmoleküls, das zwei Nitrilfunktionen enthielt, im Komplex mit der reversen Transkriptase des HIV-1<sup>[130]</sup> ließ eine von der Koordinationsumgebung abhängige Spektralaufspaltung erkennen. Verschiedene Bindungstypen wie Nitrile, Carbonyle, C-F- und C-D-Bindungen, Azid- und Nitroverbindungen, wurden als „Sonden“ für elektrische Felder von Proteinen in der Stark-Spektroskopie genutzt. Die gemessenen Stark-Verschiebungen, Signalpositionen und Absorptionsquerschnitte können zum Design von Aminosäure-Markern genutzt werden, um die lokale Umgebung in Proteinen zu sondieren.<sup>[131]</sup> Zudem können 2D-Techniken<sup>[118,133]</sup> auch Schwingungsenergietransferpfade verfolgen.<sup>[132]</sup> Schwingungsenergielaxationen wurden mithilfe der semi-klassischen Näherung quantenmechanischer Kraftfeldkorrelationsfunktionen simuliert.<sup>[134]</sup>

2D-Methoden können auch genutzt werden, um Reaktionsgeschwindigkeiten, Mechanismen und Ausbeuten zu untersuchen. Im thermischen Gleichgewicht äquilibrieren kleine Peptide in Lösung schnell (in 10–100 ps) zwischen verschiedenen Konformationen, wobei die Dynamik der transienten Spezies die Faltung beeinflussen kann. Hochstrasser und Kim<sup>[135]</sup> sowie Fayer et al.<sup>[136]</sup> setzten unabhängig voneinander eine 2DIR-Methode ein, um die ultraschnelle Dynamik von Wasserstoffbrücken in Solvat-Solvens-Komplexen zu untersuchen. Hamm et al. verwendeten eine 2DIR-Nichtgleichgewichtsaustauschspektroskopie zur Untersuchung der lichtinduzierten Migration von Proteinliganden.<sup>[137]</sup> Die Bindungskonnektivität in Molekülen wurde anhand von relaxationsunterstützten 2DIR-Signalen bestimmt, wobei als wesentliche Parameter die charakteristische Ankunftszeit des intermodalen Energietransports und ein Kreuzsignalverstärkungskoeffizient dienten. Spektralinterferometrisch detektierte 2DIR-Spektren der gekoppelten Carbonyl-Streckschwingungen von  $[\text{Rh}(\text{CO})_2(\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2)]$  in Hexan vermochten die Struktur in einem Zeitfenster von etwa 20 ps zu charakterisieren.<sup>[138]</sup>

### 3. Hamilton-Operatoren für Amid-Schwingungen in Polypeptiden

Schwingungsspektren werden gewöhnlich durch Normalmoden beschrieben, die die kollektiven Bewegungen der Atome repräsentieren, wenn alle Anharmonizitäten vernachlässigt werden. Die Frequenzen der Normalmoden und die Auslenkungen individueller Atome lassen sich mithilfe von Kraftfeldern, wie sie in Standard-MD-Codes implementiert sind, berechnen. Die Kraftfelder sind so parametrisiert, dass sie langsame Rückgratbewegungen abbilden. Hochfrequente Schwingungen wie die Amidbanden von Peptiden erfordern genauere Ab-initio-Rechnungen.

Ein Peptid kann als eine durch Amidbindungen ( $\text{O}=\text{C}-\text{N}-\text{H}$ ) verknüpfte Perlenkette betrachtet werden (Abbildung 3). Die Amidbindungen haben partiellen Doppelbindungs-

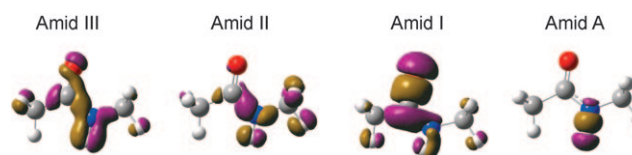


**Abbildung 3.** Amid-Bindungen mit Ramachandran-Winkeln ( $\phi$  und  $\psi$ ). Die Ebenen der Peptideinheiten sind grau gekennzeichnet, „sc“ steht für Seitenkette.

charakter und liegen aus sterischen Gründen fast nur in der *trans*-Konfiguration vor, sodass die Region zwischen zwei aufeinanderfolgenden  $\alpha$ -Kohlenstoffatomen (Peptideinheit) starr und planar ist. Die Struktur des Peptidrückgrats wird durch die zwei Ramachandran-Diederwinkel  $\phi$  und  $\psi$  je Amidbindung beschrieben. Das Infrarotspektrum einer Rückgrat-Peptidbindung besteht aus vier Amidbanden, die als Amid I, II, III und A bezeichnet werden,<sup>[139–41]</sup> und die von den gekoppelten lokalisierten Amidschwingungen aller Peptideinheiten herrühren (lokale Amid-Moden; LAMs). Die Lokalisierung lässt sich gut darstellen, indem man die molekulare Ladungsdichte  $\rho(\mathbf{r})$  in Form von Atomauslenkungen entwickelt [Gl. (1)].

$$\rho(\mathbf{r}) = \rho^{(0)}(\mathbf{r}) + \sum_{mi} \left( \frac{\partial \rho(\mathbf{r})}{\partial q_{mi}} \right) q_{mi} + \dots \quad (1)$$

Hierbei ist  $q_{mi}$  die  $i$ -te Schwingungsmoden der  $m$ -ten Peptidbindung. Die Übergangsladungsdichten (TCD, transition charge density)  $\partial \rho / \partial q_{mi}$ <sup>[142]</sup> gibt die Veränderung der elektronischen Struktur durch die  $q_{mi}$ -Schwingung wieder. Die TCD-Konturen (0.01 esu/Bohr) der vier Amidbanden von *N*-Methylacetamid (NMA), einem Modellsystem der Amidbindung, sind in Abbildung 4 gezeigt. Die Amid-III- ( $\approx 1200 \text{ cm}^{-1}$ ) und Amid-II-Banden ( $\approx 1500 \text{ cm}^{-1}$ ) werden der mit der N-H-Biegeschwingung gekoppelten C-N-Streckschwingung zugeordnet. Die Amid-I-Bande ( $1600\text{--}1700 \text{ cm}^{-1}$ ) entstammt der C=O-Streckschwingung, gekoppelt mit der phasengleichen N-H-Biegeschwingung und der C-H-Streckschwingung. Die Amid-A-Bande ( $\approx 3500 \text{ cm}^{-1}$ ) entstammt der fast unvermischten N-H-Streckschwingung.<sup>[139,140,143]</sup> Die TCDs dieser vier Banden sind sehr stark an



**Abbildung 4.** Konturdarstellung (0.01 esu/Bohr) der Übergangsladungsdichten (TCDs) der vier Amidbanden von *N*-Methylacetamid (NMA). Violette und braune Konturen kennzeichnen für positive bzw. negative Werte.



den vier an der Amidbindung beteiligten Atomen (O, C, N und H) lokalisiert. Die elektronische Überlappung zwischen den Amideinheiten ist gering und auf unmittelbar benachbarte Peptidbindungen beschränkt. Indem man den Hamilton-Operator und die Übergangsdipolmomente aller Amidbanden (I, II, III und A) durch die Ramachandran-Winkel parametrisiert, lassen sich redundante Normalmodenberechnungen für verschiedene Konformere vermeiden.

Die hohe Empfindlichkeit, mit der die Schwingungsübergänge auf Änderungen der lokalen Struktur und der Wasserstoffbrückenumgebung reagieren, macht die Amidbanden zu idealen Spektralmerkmalen für die Differenzierung sekundärer Strukturmodule und die Beobachtung von Umgebungseinflüssen.<sup>[144]</sup> Die intensive und spektral isolierte Amid-I-Bande ist für Strukturbestimmungen besonders geeignet, und die Veränderung ihrer Frequenz in Abhängigkeit von der Sekundärstruktur und der Konformation wird vielfach als Indikator für die Strukturbestimmung von Polypeptiden und Proteinen genutzt.<sup>[56,57,105,143–146]</sup> Bei  $\alpha$ -helicalen Peptiden liegt die Amid-I-Bande bei 1650–1655 cm<sup>-1</sup>, während  $\beta$ -Faltblätter meist eine starke Bande bei 1612–1640 cm<sup>-1</sup> und eine schwächere bei 1685 cm<sup>-1</sup> aufweisen. Bei ungeordneten Strukturen liegt die Bande gewöhnlich bei 1645 cm<sup>-1</sup>, nahe am Wert für  $\alpha$ -Helices. Antiparallele  $\beta$ -Faltblätter zeigen eine starke Amid-II-Bande bei 1510–1530 cm<sup>-1</sup>, während parallele  $\beta$ -Faltblätter höherfrequente Banden erzeugen (1530–1550 cm<sup>-1</sup>). Die Substitution mit Deuterium führt zu einer deutlichen Verschiebung zu niedrigeren Frequenzen ( $\approx$  1460 cm<sup>-1</sup>). Die Amid-III-Bande ist meist schwächer als die Amid-I- und Amid-II-Banden und wird durch Deuterium-Substitution ebenfalls zu niedrigeren Frequenzen verschoben (960–1000 cm<sup>-1</sup>). Die Bande korreliert normalerweise nicht mit der Sekundärstruktur des Proteins, ist aber empfindlich in Bezug auf Wasserstoffbrücken und lokale Ramachandran-Winkel.<sup>[19]</sup> In Kombination mit der Amid-I-Bande wird die Amid-III-Bande gelegentlich zur Differenzierung zwischen  $\beta$ -Faltblättern und ungeordneten Strukturen genutzt, was anhand der Amid-I-Bande allein nicht möglich ist. Die Überlappung der Amid-A-Bande mit den intensiven O-H-Banden von Wasser erschwert die Aufzeichnung und Interpretation dieser Bande erheblich.

Ein für 2DIR-Simulationen von Peptiden geeigneter Hamilton-Operatoren wurde durch Reihenentwicklung konstruiert (6. Ordnung im Potential der in den einzelnen Peptideinheiten lokalisierten Amid-Moden, 4. Ordnung in benachbarten Kopplungen und 2. Ordnung in nicht-benachbarten elektrostatischen Kopplungen).<sup>[142,148]</sup> Wechselwirkungen zwischen LAMs mit nicht-überlappender TCD sind rein elektrostatisch und lassen sich durch Gleichung (2) ausdrücken:

$$\sum_{m,n} \sum_{i,j} \int d\mathbf{r} \int d\mathbf{r}' \frac{\partial \rho(\mathbf{r})}{\partial q_{mi}} \frac{\partial \rho(\mathbf{r}')}{\partial q_{nj}} q_{mi} q_{nj} \quad (2)$$

Durch Diagonalisierung des lokalen Hamilton-Operators jeder Amidbindung erhalten wir im Bereich von 0–7000 cm<sup>-1</sup> für jede Peptideinheit 14 lokale Eigenzustände (vier Fundamentalschwingungen, vier Obertöne und sechs Kombinationsbanden), die wir als lokale Amidzustände (LAS) be-

zeichnen. Ferner definieren wir die excitonischen Erzeugungs- und Vernichtungsoperatoren des  $a$ -ten LAS in der  $m$ -ten Peptideinheit als:  $\hat{B}_{ma} \equiv |ma\rangle\langle m0|$  und  $\hat{B}_{ma}^\dagger \equiv |m0\rangle\langle ma|$ , wobei  $|m0\rangle$  für den Grundzustand steht. Diese Definition erfüllt die Kommutationsbeziehung nach Pauli:

$$[B_{ma}, B_{nb}^\dagger] = \delta_{n,m} \delta_{a,b} (1 - \sum_c B_{mc}^\dagger B_{mc}) - \delta_{m,n} B_{mb}^\dagger B_{ma}$$

Der Hamilton-Operator des Peptids kann dann unter Verwendung dieser Operatoren wie in Gleichung (3) ausgedrückt werden:<sup>[148]</sup>

$$\begin{aligned} \hat{H} = & \sum_m \sum_a \omega_{ma} \hat{B}_{ma} B_{ma}^\dagger \\ & + \sum_{m,n}^{|m-n|=1} \left\{ \sum_{a,b} J_{mn,ab}(\phi, \psi) \hat{B}_{ma} \hat{B}_{nb}^\dagger + \sum_{a,b} K_{mn,ab}(\phi, \psi) \hat{B}_{ma} \hat{B}_{nb}^\dagger \hat{B}_{ma}^\dagger \hat{B}_{nb}^\dagger \right\} \\ & + \sum_{m,n}^{|m-n|>1} \left\{ \sum_{a,b} K'_{mn,ab} (\hat{B}_{ma}^\dagger \hat{B}_{nb} + \hat{B}_{ma} \hat{B}_{nb}^\dagger + \hat{B}_{ma} \hat{B}_{nb} + \hat{B}_{ma}^\dagger \hat{B}_{nb}^\dagger) \right. \\ & \left. + \sum_{a,b,c} K''_{mn,abc} (\hat{B}_{na}^\dagger \hat{B}_{nb} \hat{B}_{mc} + \hat{B}_{na} \hat{B}_{nb}^\dagger \hat{B}_{mc}^\dagger) + \sum_{a,b,c,d} K'''_{mn,abcd} \hat{B}_{ma}^\dagger \hat{B}_{mb} \hat{B}_{nc}^\dagger \hat{B}_{nd} \right\} \end{aligned} \quad (3)$$

Der erste Term steht für den lokalen Hamilton-Operator. Die Kopplungen zwischen benachbarten Peptideinheiten (zweiter Term) wurden als Funktion der Ramachandran-Winkel ( $\phi$  und  $\psi$ ) auf BPW91/6-31G(d,p)-Niveau berechnet, wobei ein für Glycindipeptid(GLDP)-Konfigurationen entwickeltes anharmonisches Schwingungspotential 4. Ordnung eingesetzt wurde. Kopplungen zwischen nicht-benachbarten Gruppen (die beiden letzten Terme) wurden durch ein elektrostatisches Modell beschrieben. Die Multipolentwicklung der Übergangsladungsdichtekopplungen (TCDC; transition charge density couplings) bis zur 4. Ordnung ergibt Terme für die Dipol-Dipol-Wechselwirkung ( $\approx R^{-3}$ ), die Dipol-Quadrupol-Wechselwirkung ( $\approx R^{-4}$ ) und die Quadrupol-Quadrupol- bzw. Dipol-Oktopol-Wechselwirkung ( $\approx R^{-5}$ ), wobei  $R$  der Abstand zwischen den Gruppen ist.

Torii und Tasumi (TT) entwickelten eine solche Potentialkarte für die Nachbarkopplungen der Amid-I-Bande mithilfe von restriktiven Hartree-Fock(HF)-Elektronenstrukturrechnungen von GLDP.<sup>[146]</sup> Die Kopplung der nicht-benachbarten Peptideinheiten in der Amid-I-Bande wurde durch das Übergangsdipolkopplungsmodell (TDC; transition dipole coupling) angenähert.<sup>[149,150]</sup> Größe, Richtung und Lokalisierung des Übergangsmoments wurden durch Angleich an initio berechneter Kopplungskonstanten für zweitnächste Nachbarn analysiert (der Betrag des Übergangsdipols war  $(\partial\mu/\partial q) = 2.73 \text{ DA}^{-1}$  bei einem Winkel von 10.0° zur C=O-Bindung). Gorbunov, Kosov und Stock<sup>[151]</sup> entwickelten eine ähnliche Potentialkarte auf höheren Rechenniveaus (MP2 und B3LYP). Um die Beiträge höherer Multipole zur Amid-I-Mode zu berücksichtigen, approximierten Woutersen und Hamm Übergangsladungsdichtekopplungen durch DFT-Rechnungen der Mulliken-Partialladungen von NMA.<sup>[152]</sup> Das Verfahren wurde später durch Einführung von Multipolbasierten Ladungen optimiert.<sup>[153]</sup> Die Genauigkeit der lokalen Frequenzen und IR-Intensitäten der Amid-I-Mode bezüglich Referenz-DFT-Rechnungen konnte durch die Einbe-

ziehung höherer Multipole verbessert werden (auf  $0.1\text{ cm}^{-1}$  für Frequenzen und  $0.02$  für IR-Intensitäten; siehe Tabelle V in Lit. [153]). Die Berücksichtigung höherer Multipole ist vor allem für die II-, III- und A-Bande, weniger aber für die Amid-I-Bande wichtig: Die Amid-II- und Amid-III-Banden sind stärker über die Peptidbindung delocalisiert, und die A-Bande hat einen kleineren Übergangsdipol (siehe auch Abbildung 8 in Lit. [147]).

Die Kopplung des Dipols mit dem Strahlungsfeld ist durch Gleichung (4) gegeben:

$$H_{\text{int}} = \sum_m \sum_a (\mu_{ma} B_{ma} + \mu_{ma}^* B_{ma}^*) \quad (4)$$

Zur Berücksichtigung der Chiralität wurden magnetische Momente in die Gleichung einbezogen. Ableitungen der magnetischen Momente in Bezug auf die lokalisierten Amid-Moden hängen von den Ramachandran-Winkeln  $\psi$  und  $\phi$  ab. Eine Konturkarte für die Ableitungen der magnetischen Momente einer chiralen Modellpeptideinheit wurde durch DFT-Rechnungen erhalten (siehe Abbildung 1 in Lit. [148]), wobei die axialen Atomtensoren und die Normalschwingungen herangezogen wurden.<sup>[154]</sup>

### 3.1. Elektrostatistische Fluktuationen des lokalen Hamilton-Operators

Die lokalen Hamilton-Operatoren [Gl. (3)] hängen von der elektrostatischen Umgebung ab, die sich aus den umgebenden Peptidresten und dem Solvens ergibt. Zum Beispiel werden die Amid-I-Banden in Wasser durch die Bildung von Wasserstoffbrücken rotverschoben. Eine elektrostatische Modellierung der fluktuierenden lokalen Hamilton-Operatoren erfordert iterative Ab-initio-Rechnungen der Schwingungspotentiale der Peptidbindungen in Gegenwart der benachbarten Peptidreste und des Lösungsmittels. Um etwa die 2DIR-Signalförmigkeit von NMA zu simulieren, muss ein Hamilton-Operator entlang der MD-Trajektorien verwendet werden, wobei ca.  $10^5$  Einzelstrukturen eingehen. Solche aufwändigen Ab-initio-Rechnungen lassen sich durch eine elektrostatische Parametrisierung des Hamilton-Operators vermeiden. Für kleinere Chromophore genügt eine lineare Stark-Modellierung für ein elektrisches Feld an einem Referenzpunkt.<sup>[120,155,156,157]</sup> Für die Amid-Schwingungen von Proteinen ist dieses Modell jedoch nicht geeignet; in diesem Fall ist zu berücksichtigen, dass an der Peptidbindung ein uneinheitliches elektrisches Feld anliegt.<sup>[142]</sup>

Durch Analyse der Normalschwingungen von NMA-Wasser-Clustern auf RHF-Niveau entwickelten Ham und Cho (HC) eine Konturkarte zur Parametrisierung der Amid-I-Bande als lineare Funktion der elektrostatischen Potentiale an den C-, O-, N- und H-Atomen sowie an zwei Methylgruppen.<sup>[158,159]</sup> Schmidt, Corcelli und Skinner (SCS)<sup>[160]</sup> konstruierten mithilfe von DFT-Rechnungen eine ähnliche Konturkarte der Amid-I-Frequenz von deuteriertem NMA (NMAD), wobei die Frequenz als eine lineare Funktion der elektrischen Felder an den C-, O-, N- und H-Atomen para-

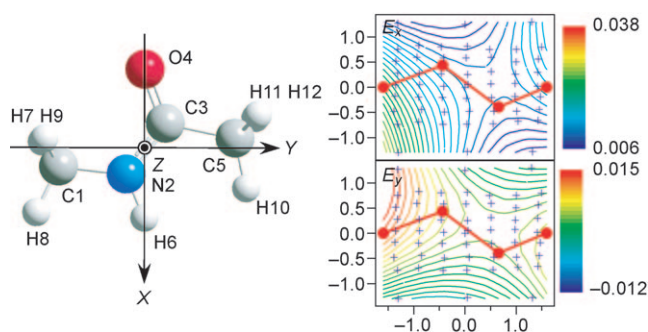
metrisiert wurde. Watson und Hirst fanden, dass sich die Genauigkeit der Amid-I-Frequenzen von NMA in Wasser durch zusätzliche Referenzpunkte des elektrostatischen Potentials in der Amidbindung (Mittelpunkte der C-O-, C-N- und N-H-Bindungen) optimieren lässt.<sup>[161]</sup>

Wir haben die Fundamentalschwingungen, die Obertöne, die Kombinationsbanden und die Übergangsdipole aller Amidbanden (I, II, III und A) als quadratische Funktionen der elektrischen Multipolfelder bis zur zweiten Ableitung des elektrischen Feldes an einem Mittelpunkt der O- und H-Atome des Amids parametrisiert (HM-Karte).<sup>[142]</sup> Die Konturkarte wurde durch Eigenzustandsberechnungen des anharmonischen Schwingungspotentials 6. Ordnung (BPW91/6-31G(d,p)-Niveau) der fünf relevanten Normalschwingungen von NMA in Gegenwart unterschiedlicher Multipolfelder erstellt. Neben der Parametrisierung der Fundamentalschwingungen und der Anharmonizitäten wurden auch Geometrieänderungen und Modenvermischungen durch die elektrischen Multipolfelder einbezogen. Der Mittelwert und die Korrelationen zwischen den Frequenzfluktuationen der Fundamentalschwingungen und der Anharmonizitäten bestimmen die relativen Positionen und die Intensitäten der zwei positiven (stimulierte Emission/Grundzustandssättigung) und negativen (Absorption angeregter Zustände) Signale im nichtlinearen Infrarotspektrum.<sup>[162]</sup> Im Unterschied zu den anderen Konturkarten benötigt dieses Modell keine Anpassung an das jeweilige Lösungsmittel. Jansen und Knoester<sup>[163]</sup> wendeten einen ähnlichen Ansatz auf die Amid-I-Frequenz an und konstruierten dazu anharmonische Schwingungspotentiale für NMA-Einzelmoden, eingebettet in verschiedene Ladungsverteilungen des Lösungsmittels. Die Amid-I-Frequenzen wurden durch das elektrische Feld und Gradienten an den C-, O-, N- und H-Atomen parametrisiert. Die Konturkarte schließt keine Modenvermischung ein. Frequenzen und IR-Intensitäten eines Pentapeptids in verschiedenen Gasphasenkonfigurationen,<sup>[161]</sup> die mit dieser Konturkarte in Kombination mit Übergangsladungskopplungen und Nachbarkopplungsmodellen berechnet wurden, stimmten gut mit DFT-Ergebnissen überein.<sup>[153]</sup>

Schon in früheren Studien wurden die Torii-Tasumi-Kopplungen zusammen mit unserem lokalen Hamilton-Operator genutzt.<sup>[164]</sup> Der vollständige Hamilton-Operator [Gl. (3)] wurde für zwei  $\alpha$ -helicale Peptide (SPE3)<sup>[145]</sup> verwendet, die später in diesem Abschnitt beschrieben werden.

Das aus einem gegebenen Amidrest und zwei benachbarten neutralen Gruppen im CHARMM27-Kraftfeld<sup>[165]</sup> gebildete Molekülsegment wurde als Stammchromophor für die Berechnung elektrostatischer Wechselwirkungen eingesetzt (Abbildung 3). Der Einfluss des restlichen Proteins und des Solvens wird durch ein fluktuierendes elektrostatisches Feld beschrieben. Das elektrostatische Potential  $U$  wird in lokalen kartesischen Koordinaten  $X_\alpha$  ( $\alpha, \beta = x, y, z$ ) um den Mittelpunkt zwischen dem Sauerstoff- und Wasserstoffatom der Amidbindung kubisch entwickelt [Abbildung 5 und Gleichung (5)].

$$U(\mathbf{X}) = U_0 - \sum_\alpha E_\alpha X_\alpha - \frac{1}{2} \sum_{\alpha, \beta} E_{\alpha\beta} X_\alpha X_\beta - \frac{1}{6} \sum_{\alpha, \beta, \gamma} E_{\alpha\beta\gamma} X_\alpha X_\beta X_\gamma \quad (5)$$



**Abbildung 5.** Links: Molekülstruktur von NMA und das zur Beschreibung des anharmonischen Kraftfelds und des elektrostatischen Potentials verwendete Koordinatensystem. Die vier Atome der Amidgruppe (O4, C3, N2 und H6) befinden sich in der x,y-Ebene. Der Ursprung ist der Mittelpunkt zwischen dem Sauerstoff- (O4) und Wasserstoffatom (H6). Rechts: Konturdarstellungen der elektrischen Felder  $E_x$  und  $E_y$  von NMA in  $H_2O$ . Die roten Punkte kennzeichnen die vier Amidatome (O4, C3, N2 und H6). Die Rasterpunkte sind durch blaue Kreuze markiert.

Außer dem Grundwert  $U_0$  enthält Gleichung (5) insgesamt 19 unabhängige Parameter, die in einem Vektor  $\mathbf{C}$  angeordnet sind:  $\mathbf{C} = (E_x, E_y, E_z, E_{xx}, E_{yy}, E_{zz}, E_{xy}, E_{xz}, E_{yz}, E_{xxx}, E_{yyy}, E_{zzz}, E_{xxy}, E_{xxz}, E_{xzz}, E_{yyz}, E_{yzy}, E_{zyz})$  (man beachte dabei die Symmetrie  $E_{\alpha\beta} = E_{\beta\alpha}$ ).

Bei jedem Zeitschritt werden die Komponenten von  $\mathbf{C}$  durch Fehlerquadratminimierung an das elektrische Feld angepasst, das an 67 Punkten im Raum abgerastert wird, die die TCD der vier Amidbanden überspannen (Abbildung 5). Wir erwarten, dass in Regionen mit hoher TCD das elektrostatische Potential die Infrarotaktivität der dort befindlichen Schwingung beeinflusst. Die Verwendung von nur vier Rasterpunkten an den Positionen der C-, O-, N- und H-Atome erwies sich als nicht ausreichend für die Beschreibung von Lösungsmittelleffekten (insbesondere für Amid-II und -III).<sup>[142]</sup> Dies ist im Einklang mit dem Befund von Watson und Hirst, dass die Verwendung von mehr Rasterpunkten eine genauere Amid-I-Frequenz ergibt.<sup>[161]</sup> Für NMA<sup>[142]</sup> wurde die parametrische Abhängigkeit des anharmonischen Kraftfelds von den elektrostatischen Multipolkoeffizienten  $\mathbf{C}$  auf dem BPW91/6-31G(d,p)-Niveau beschrieben.<sup>[166]</sup> Von diesem Funktional weiß man, dass es die Normalschwingungen von Peptiden gut reproduziert.<sup>[167]</sup> Analytische Energiegradienten in Gegenwart von Multipolfeldern wurden auch in Gaussian03<sup>[168]</sup> implementiert, um höhere Ableitungen berechnen zu können.<sup>[169,170]</sup>

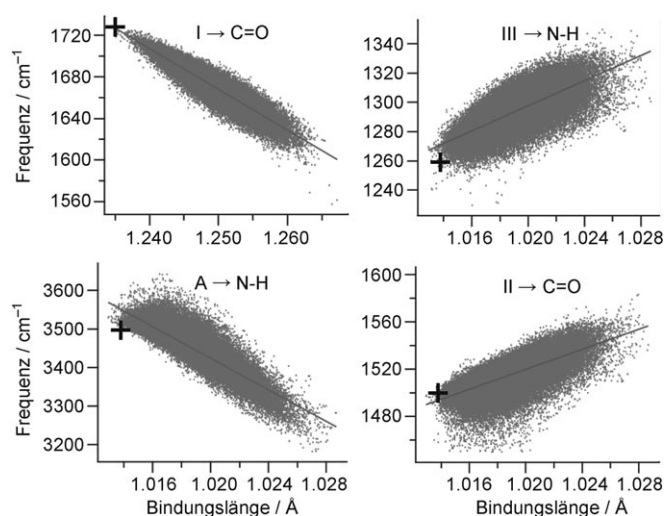
Durch Diagonalisierung des in einen harmonischen Basissatz entwickelten lokalen Hamilton-Operators wurden die lokalen Amidzustände in einem Gitternetz von elektrostatischen Multipolkoeffizienten  $\mathbf{C}$  ermittelt, wobei zur Berechnung der Schwingungskonfigurationswechselwirkung (Schwingungs-CI) der ARNOLDI-Algorithmus für die Matrixdiagonalisierung angewendet wurde. Die Übergangsschwingungsfrequenz vom Grundzustand in den LAS  $a$  und die Übergangsdipolmomente zwischen LAS  $a$  und  $b$  der  $m$ -ten Peptideinheit wurden quadratisch in  $\mathbf{C}$  entwickelt [Gl. (6) und (7)]:

$$\omega_{ma} = \omega_{ma}(\mathbf{0}) + \mathbf{O}_a^{(1)\dagger} \mathbf{C}_m + \frac{1}{2} \mathbf{C}_m^\dagger \mathbf{O}_a^{(2)} \mathbf{C}_m \quad (6)$$

$$\mu_{mab}^\alpha = \mu_{ab}^\alpha(\mathbf{0}) + \mathbf{M}_{ab}^{\alpha(1)\dagger} \mathbf{C}_m + \frac{1}{2} \mathbf{C}_m^\dagger \mathbf{M}_{ab}^{\alpha(2)} \mathbf{C}_m \quad (\alpha = x, y, z) \quad (7)$$

Für die Gasphasenfrequenzen wurden die experimentellen Werte<sup>[171]</sup> verwendet;  $\mathbf{O}_a^{(1)}$  und  $\mathbf{M}_{ab}^{(1)}$  sind Vektoren mit 19 Komponenten, die die ersten Ableitungen der Frequenz und des Übergangsdipols bezüglich  $\mathbf{C}$  darstellen.  $\mathbf{O}_a^{(2)}$  und  $\mathbf{M}_{ab}^{(2)}$  sind die  $19 \times 19$ -Matrizen der zweiten Ableitungen.

Um den Einfluss der elektrostatischen Kräfte auf die Frequenzverschiebung der Amidbanden zu ermitteln, wurden die bei unterschiedlichen Feldern optimierten C=O- und N-H-Bindungslängen bezüglich  $\mathbf{C}$  parametrisiert.<sup>[142]</sup> Wie aus der Abbildung 6 klar hervorgeht, besteht eine starke Korre-



**Abbildung 6.** Auftragung von Amidfrequenzen als Funktion der Bindungslängen. Lineare Anpassungen ergeben:  $\omega = 6549.2 - 3905 R_{\text{CO}}$  (Amid-I gegen C=O-Bindungslänge),  $\omega = 24259 - 20426 R_{\text{NH}}$  (Amid-A gegen N-H-Bindungslänge),  $\omega = -3066 + 4278 R_{\text{NH}}$  (Amid-III gegen N-H-Bindungslänge) und  $\omega = 2768 + 4204 R_{\text{NH}}$  (Amid-II gegen N-H-Bindungslänge). Die Werte für die Gasphase sind durch Kreuze markiert.

lation zwischen den vier Fundamentalschwingungen der Amide und den C=O- und N-H-Bindungslängen, was darauf hinweist, dass vom elektrischen Feld verursachte Strukturänderungen des NMA<sup>[142,146,155,172,173]</sup> maßgeblich für die Frequenzverschiebungen sind. Die positive Korrelation der beiden Biegeschwingungen mit der N-H-Bindungslänge wird auf Wasserstoffbrücken mit H6 zurückgeführt, die die N-H-Bindung strecken und das Potential entlang der Amid-I- und Amid-II-Biegemoden durch Stabilisierung der parallelen N2-H6...OH<sub>2</sub>-Struktur versteifen.

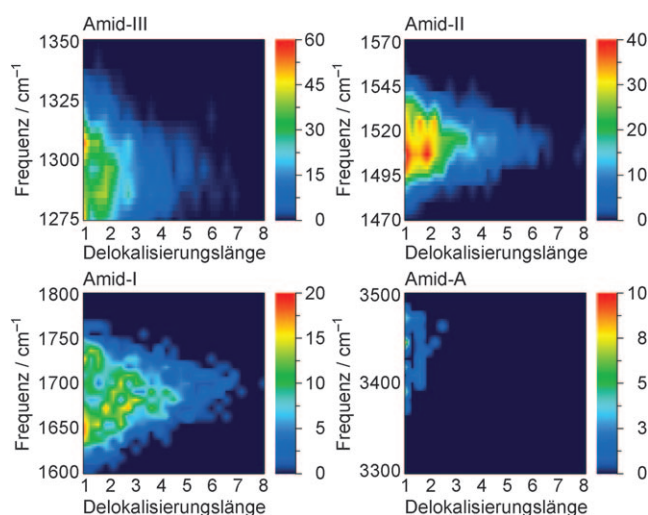
Die simulierten Bandenverschiebungen ( $-59 \text{ cm}^{-1}$ ) und Linienbreiten ( $29 \text{ cm}^{-1}$ ) der Amid-I-Bande von NMA in Wasser stimmen gut mit dem Experiment ( $-80 \text{ cm}^{-1}$  bzw.  $29 \text{ cm}^{-1}$ ) überein. In einer weiteren Studie wurde der gleiche Hamilton-Operator auf SPE3 angewendet, ein  $\alpha$ -helicales



Peptid mit 16 Untereinheiten (YGSPEAAA(KAAAA)<sub>3</sub>r, r steht für D-Arg).<sup>[145]</sup> Der fluktuierende Hamilton-Operator wurde aus 100 Einzelstrukturen einer 2-ns-MD-Trajektorie konstruiert<sup>[164]</sup> und die Schwingungseigenzustände durch Diagonalisierung des HM-Hamilton-Operators ermittelt. Ein gutes Maß für die Kohärenzlänge  $L_\nu$  des  $\nu$ -ten Schwingungseigenzustands erhält man über das Anteilsverhältnis [Gl. (8)].<sup>[54,65,174]</sup>

$$L_\nu = \left( \sum_m \left( \sum_a C_{\nu,ma}^2 \right)^2 \right)^{-1} \quad (8)$$

$C_{\nu,ma}$  ist der Reihenentwicklungskoeffizient des  $\nu$ -ten Eigenvektors des LAS  $a$  in der  $n$ -ten Peptideinheit. Die Verteilung von  $L_\nu$  über die Frequenzen der Eigenzustände ist in Abbildung 7 dargestellt. In der Amid-I-Region sind die nie-



**Abbildung 7.** Verteilung der Anteilsverhältnisse (PR; partition ratios) in Abhängigkeit von der Frequenz der Amidbanden I, II und III und A. Die mittleren Anteilsverhältnisse betragen 1.8 (Amid-I), 2.3 (Amid-II), 1.6 (Amid-III) und 1.0 (Amid-A).

derfrequenten Eigenzustände ( $\approx 1600 \text{ cm}^{-1}$ ) überwiegend an nur einer Amidbindung lokalisiert ( $\langle L_\nu \rangle \approx 1$ ), während die höherfrequenten Eigenzustände stärker delokalisiert sind. Die höherfrequenten Eigenzustände der Amid-III-Bande ( $\approx 1300 \text{ cm}^{-1}$ ) sind dagegen lokalisiert. In der Amid-II-Region tragen zwei bis drei Komponenten zur Verteilungsfunktion bei. Aufgrund der größeren Übergangsmomente, stärkeren Nachbarkopplungen und geringeren diagonalen Frequenzfluktuationen sind die Fundamentalschwingungen der Amid-II-Bande am stärksten lokalisiert ( $\langle L_\nu \rangle = 2.3$ ). Die Fundamentalschwingungen der Amid-I- und Amid-III-Banden sind über 1.8 bzw. 1.6 Amidbindungen delokalisiert. Die Amid-A-Bande ist aufgrund des geringen Übergangsmoments und der großen Frequenzfluktuation stark lokalisiert ( $\langle L_\nu \rangle = 1.0$ ), was die Interpretation von 2DIR-Signalen im Hinblick auf lokale Strukturen sehr vereinfachen kann.

#### 4. Gekoppelte lokalisierte Schwingungen im Liouville-Raum

Kohärente optische Signale lassen sich nach ihrem Potenzgesetz in Abhängigkeit vom treibenden Feld klassifizieren.<sup>[66]</sup> Die Signale stehen mit der durch externe elektrische Felder induzierten Polarisation  $P(t)$  in Beziehung. Die induzierte Polarisation kann störungstheoretisch durch Entwicklung der Dichtematrix  $\rho(t)$  in Potenzen des externen Feldes erhalten werden.<sup>[66]</sup> Die Antwortfunktion dritter Ordnung,  $R_{\nu_4\nu_3\nu_2\nu_1}^{(3)}(t_3, t_2, t_1)$ , ist der Beitrag niedrigster Ordnung zur induzierten Polarisation in isotropen Systemen [Gl. (9)]:

$$P_{\nu_4}^{(3)}(\mathbf{r}, t) = \sum_{\nu_3\nu_2\nu_1} \int_0^\infty dt_3 \int_0^\infty dt_2 \int_0^\infty dt_1 R_{\nu_4\nu_3\nu_2\nu_1}^{(3)}(t_3, t_2, t_1) E_{\nu_3}(\mathbf{r}, t-t_3) E_{\nu_2}(\mathbf{r}, t-t_2-t_3) E_{\nu_1}(\mathbf{r}, t-t_1-t_2-t_1) \quad (9)$$

Hierbei sind  $t_1$ ,  $t_2$  und  $t_3$  die Wechselwirkungsintervalle zwischen den aufeinanderfolgenden optischen Pulsen  $E(\mathbf{r}, t)$  (siehe Abbildung 1).  $\nu_j$  sind die kartesischen Komponenten der Felder und Polarisationen. Die Antwortfunktionen sind Tensoren von Systemeigenschaften, die alle relevanten molekularen Informationen enthalten.  $R^{(1)}$  ist ein Tensor zweiten Ranges, der zwei Vektoren ( $\mathbf{E}$  und  $\mathbf{P}$ ) verknüpft;  $R^{(3)}$  ist ein Tensor vierten Ranges.

Ein heterodyn detektierendes Vier-Wellen-Mischungsexperiment (Abbildung 1)<sup>[175]</sup> besteht aus vier Pulsen. In idealen impulsiven Messungen sind diese Pulse alle zeitlich wohlgeordnet, gut separiert und viel kürzer als die relevanten molekularen Zeitskalen. Unter diesen Randbedingungen lassen sich alle Integrationen in Gleichung (9) eliminieren, und das optische Signal ist dann direkt proportional zur Antwortfunktion. Die Antwort dritter Ordnung ist in Abbildung 8

$$R^{(3)}(t_3, t_2, t_1) = \left( \frac{i}{\hbar} \right)^3 \langle V | \mathcal{G}(t_3) \mathcal{V} \mathcal{G}(t_2) \mathcal{V} \mathcal{G}(t_1) \mathcal{V} \rangle$$

**Abbildung 8.** Schematische Darstellung der Antwortfunktion dritter Ordnung.

gezeigt. Zu Beginn ist das System im thermischen Gleichgewicht, und die Green'sche Funktion  $\mathcal{G}(t_n)$  beschreibt die Entwicklung der molekularen Zeitskala (ohne Felder). Zum Zeitpunkt  $t=0$  wechselwirkt das System mit dem ersten Puls ( $\mathcal{V}_{\nu_1}$ ), propagiert frei während  $t_1$  ( $\mathcal{G}(t_1)$ ), wechselwirkt mit dem zweiten Puls ( $\mathcal{V}_{\nu_2}$ ) zum Zeitpunkt  $t_1$ , propagiert im Intervall  $t_2$  ( $\mathcal{G}(t_2)$ ), wechselwirkt mit dem dritten Puls ( $\mathcal{V}_{\nu_3}$ ) bei  $t_1+t_2$ , propagiert während  $t_3$  ( $\mathcal{G}(t_3)$ ) und wechselwirkt schließlich mit dem Signalpuls ( $\mathcal{V}_{\nu_4}$ ) bei  $t_1+t_2+t_3$  unter Erzeugung des Antwortsignals. Der Dipoloperator kann dabei dreimal entweder auf den ket- oder bra-Vektor wirken.

Die Antwortfunktion dritter Ordnung ist als die Summe von  $2^3 = 8$  Vierpunkt-Korrelationsfunktionen<sup>[66]</sup> gegeben, die



den acht Grundpfaden im Liouville-Raum entsprechen [Gl. (10)]:

$$R_{\nu_3\nu_2\nu_1}^{(3)}(t_3, t_2, t_1) = \left(\frac{i}{\eta}\right)^3 \sum_{\alpha=1}^8 R_{\alpha}(t_3, t_2, t_1) \quad (10)$$

Abhängig von der Pulsfolge und der Nachweismethode können verschiedene Experimente bestimmte Terme in Abbildung 8 selektieren. Zur Berechnung des Antwortsignals muss das elektrische Feld  $\mathbf{E}$  in die Moden entwickelt werden [Gl. (11)]:

$$E_i(\mathbf{r}, t) = \sum_j \left[ \mathcal{E}_{\nu_j}(t - \tau_j) \exp(i\mathbf{k}_j \cdot \mathbf{r} - i\omega_j(t - \tau_j) + i\phi_j) + \mathcal{E}_{\nu_j}^*(t - \tau_j) \exp(i\mathbf{k}_j \cdot \mathbf{r} + i\omega_j(t - \tau_j) - i\phi_j) \right] \quad (11)$$

Die Pulse  $j = 1, 2, 3$  und  $s$  sind mit dem Wellenvektor  $\mathbf{k}_j$ , der Trägerfrequenz  $\omega_j$ , der Phase  $\phi_j$  und der komplexen Einhüllenden  $\mathcal{E}_{\nu_j}(t - \tau_j)$  an  $\tau_j$  zentriert (1, 2 und 3 bezeichnen die drei ankommenden Pulse,  $s$  ist der Signalpuls). Der Puls  $\mathbf{k}_1$  kommt zuerst, gefolgt von  $\mathbf{k}_2$ ,  $\mathbf{k}_3$  und  $\mathbf{k}_s$ . Das heterodyne Signal  $S(t)$ , definiert als die von den Strahlungspulsen 1–3 hervorgerufene Transmissionsänderung der Mode  $s$ , steht in Beziehung mit  $\mathbf{P}^{(3)}$  (der Polarisation dritter Ordnung) und den externen Feldern [Gl. (12)], wobei  $\mathbf{r}$  über das Wechselwirkungsvolumen der Probe integriert wird.

$$P_{k_s, \nu_s}^{(3)}(t) = \int d\mathbf{r} P_{\nu_s}^{(3)}(\mathbf{r}, t) \exp(-i\mathbf{k}_s \cdot \mathbf{r}) \quad (12)$$

Nichtlineare kohärente Signale sind stark gerichtet und erscheinen nur dann, wenn  $\mathbf{k}_s$  entlang einer der phasengleichen Richtungen  $\mathbf{k}_s = \pm \mathbf{k}_3 \pm \mathbf{k}_2 \pm \mathbf{k}_1$  (mit den entsprechenden Frequenzen  $\omega_s = \pm \omega_3 \pm \omega_2 \pm \omega_1$ ) liegt. Dieses wichtige Merkmal der Kohärenzspektroskopie rührt daher, dass wir die von unterschiedlichen Molekülen erzeugten *Feldamplituden* addieren, wobei die Probe wesentlich größer ist als die optische Wellenlänge.<sup>[297]</sup> Zufällige Phasenausrichtungen führen dann in allen anderen Raumrichtungen zur Löschung des Signals. Inkohärente Signale, z.B. Fluoreszenzsignale, werden dagegen durch Addition der *Intensitäten* (der Amplitudenquadrate) erhalten und sind im Wesentlichen isotrop.

Ähnlich wie bei der NMR-Spektroskopie hat man für die vielen Kombinationen von Vektoren und Pulsfolgen eine Vielzahl von Namen und Akronymen eingeführt (Photonenecho- und Transientenrasterspektroskopie, CARS, HORSES etc.). Wir möchten diese Nomenklatur vermeiden und die Signale auf vier grundlegende Techniken zurückführen:  $\mathbf{k}_I = -\mathbf{k}_1 + \mathbf{k}_2 + \mathbf{k}_3$ ,  $\mathbf{k}_{II} = \mathbf{k}_1 - \mathbf{k}_2 + \mathbf{k}_3$ ,  $\mathbf{k}_{III} = \mathbf{k}_1 + \mathbf{k}_2 - \mathbf{k}_3$  und  $\mathbf{k}_{IV} = \mathbf{k}_1 + \mathbf{k}_2 + \mathbf{k}_3$ .

Die wichtigsten Beiträge zu den Resonanzsignalen ergeben sich aus Termen, die man erhält, wenn das Feld und die molekularen Frequenzen in Gleichung (9) entgegengesetzte Vorzeichen haben. Andere stark oszillierende Terme (mit

gleichem Vorzeichen) können dagegen vernachlässigt werden. Mithilfe der daraus folgenden Näherung der rotierenden Welle (RWA; rotating wave approximation) kann jedes phasengleiche Signal durch eine spezifische Kombination von Pfaden im Liouville-Raum beschrieben werden. Beispielsweise erhalten wir für die  $\mathbf{k}_I$ -Technik Gleichung (13):

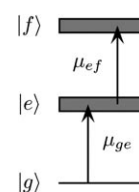
$$P_{k_I, \nu_I}(t) = \exp[-i\omega_I(t - \tau_3) - i(\omega_2 - \omega_1)(\tau_3 - \tau_2) + i\omega_1(\tau_2 - \tau_1)] \times \sum_{\nu_3, \nu_2, \nu_1} \int_0^\infty dt_3 \int_0^\infty dt_2 \int_0^\infty dt_1 R_{k_I, \nu_I, \nu_3, \nu_2, \nu_1}^{(3)}(t_3, t_2, t_1) \mathcal{E}_{\nu_3}(t - t_3 - \tau_3) \mathcal{E}_{\nu_2}(t - t_3 - t_2 - \tau_2) \times \mathcal{E}_{\nu_1}^*(t - t_3 - t_2 - t_1 - \tau_1) \exp[i\omega_I t_3 + i(\omega_2 - \omega_1)t_2 - i\omega_1 t_1] \quad (13)$$

Die Abhängigkeit von  $R_{k_I, \nu_I, \nu_3, \nu_2, \nu_1}^{(3)}(t_3, t_2, t_1)$  vom Wellenvektor folgt aus der Selektion der RWA-Pfade.

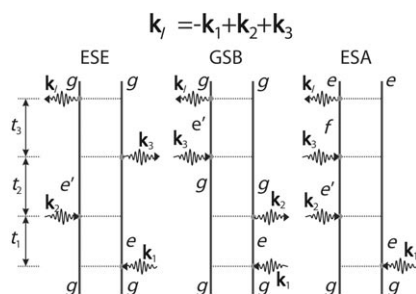
Um die Näherung der rotierenden Welle anwenden zu können, muss das Molekülmodell spezifiziert werden. Die Energieniveaus der Amide bestehen aus drei gut separierten Banden (Abbildung 9). Erlaubt sind nur Übergänge zwischen dem Grundzustand  $g$  und der Schar des ersten angeregten Zustands  $e$  sowie zwischen den Scharen des ersten und zweiten angeregten Zustands  $f$ . Die Antwortfunktionen lassen sich durch Summierung aller möglichen Übergänge zwischen Schwingungseigenzuständen berechnen. Das nichtlineare Antwortsignal verschwindet für harmonische Schwingungen und lässt sich daher Anharmonizitäten zuschreiben. Die zum Signal beitragenden Terme können durch Feynman-Diagramme dargestellt werden, die die Entwicklung der Dichtematrix abbilden und nach den folgenden Regeln konstruiert werden:

1. Die Dichtematrix wird durch zwei vertikale Linien dargestellt, die dem ket- (linke Linie) und dem bra-Vektor (rechte Linie) entsprechen.
2. Die Zeitachse verläuft vertikal von unten nach oben.
3. Wechselwirkungen mit einem Strahlungsfeld werden durch eine gewellte Linie angedeutet. Nach rechts zeigende Pfeile mit der Bezeichnung  $\mathbf{k}_j$  repräsentieren Beiträge von  $\mathcal{E}_j \exp(-i\omega_j t + i\mathbf{k}_j \cdot \mathbf{r})$  zur Polarisation; nach links weisende Pfeile stellen einen Beitrag für den Term  $\mathcal{E}_j^* \exp(i\omega_j t - i\mathbf{k}_j \cdot \mathbf{r}) \omega_j (>0)$  dar.
4. Jedes Diagramm hat das Nettovorzeichen  $(-1)^n$ , wobei  $n$  die Anzahl der Wechselwirkungen von der rechten Seite (bra) festlegt (eine Wechselwirkung  $\hat{v}$ , die von rechts auf die Liouville-Gleichung als Kommutator wirkt, trägt ein Minuszeichen).

Die in Abbildung 10 für die  $\mathbf{k}_I$ -Technik abgebildeten Feynman-Diagramme zeigen den Zustand der Dichtematrix in jedem Zeitintervall. Die Berechnung der Signale erfordert



**Abbildung 9.** Energieniveauschema der betrachteten Systeme.  $g$  steht für den Grundzustand,  $e$  für die Schar der ersten angeregten Zustände und  $f$  für die Schar der zweiten angeregten Zustände.  $\mu_{ge}$  und  $\mu_{ef}$  sind die entsprechenden Übergänge, die durch Pulse induziert werden können.



**Abbildung 10.** Darstellung der Pfade im Liouville-Raum durch doppel-seitige Feynman-Diagramme und ihre Beiträge zum  $\mathbf{k}_f$ -Signal innerhalb der Näherung der rotierenden Welle. Die drei Pfade werden als Emission des angeregten Zustands (ESE; excited-state emission), Ausbleichen des Grundzustands (GSB; ground-state bleaching) und Absorption im angeregten Zustand (ESA; excited-state absorption) bezeichnet.

meist mehrfache Integrationen über die jeweiligen Pulsformen [Gl. (9)], denn die Form und relativen Phasen der Pulse sind Parameter, die das Signal wesentlich beeinflussen. Kohärente Kontroll- und Pulsformungs-Algorithmen können genutzt werden, um für bestimmte Zielstellungen maßgeschneiderte Signale zu erzeugen.<sup>[64]</sup> Hier wollen wir uns auf Experimente mit zeitlich gut separierten Pulsen beschränken. Mehrdimensionale Signale werden in der Frequenzdomäne durch mehrfache Fourier-Transformation von  $S^{(3)}_{\mathbf{k}}(t_3, t_2, t_1)$  in Bezug auf die Zeitabstände der Pulse erhalten. Wir betrachten das mit Gleichung (14) ausgedrückte Signal:

$$S^{(3)}_{\mathbf{k}}(\Omega_3, t_2, \Omega_1) = \int_0^\infty dt_1 \int_0^\infty dt_2 e^{i\Omega_3 t_3 + i\Omega_1 t_1} S^{(3)}_{\mathbf{k}}(t_3, t_2, t_1) \quad (14)$$

Dieses Signal ist in Lit. [176] in Form der Gleichungen (15)–(17) gegeben. Diese Ausdrücke zeigen, wie Pulsformen die Übergänge innerhalb der Pulsbreite selektieren können.  $e$  und  $e'$  laufen über die Schar des ersten angeregten Zustands, und  $f$  enthält die Schar des zweiten angeregten Zustands (Abbildung 9).  $\omega_1$ ,  $\omega_2$  und  $\omega_3$  sind die Trägerfrequenzen der drei ersten Pulse.  $\omega_{ab} = (\epsilon_a - \epsilon_b)/\hbar$  sind die Übergangsfrequenzen, wobei  $\epsilon$  für die Energien der Zustände und  $\xi_{ab} = \omega_{ab} - i\gamma_{ab}$  für die komplexen Übergangsfrequenzen stehen, die die Phasenentkopplungsraten  $\gamma$  enthalten. Im impulsiven Limit (große Bandbreite) setzen wir einfach  $\mathcal{E}(\omega) = 1$ .

$$S_{\mathbf{k}_f, \text{GSB}}(\Omega_3, t_2, \Omega_1) = -\left(\frac{1}{\hbar}\right)^3 \sum_{e'e} \frac{(\mu_{ge'} \cdot \mathcal{E}_s^*(\omega_s - \omega_{e'g}))(\mu_{e'g} \cdot \mathcal{E}_3(\omega_{e'g} - \omega_3))(\mu_{eg} \cdot \mathcal{E}_2(\omega_{eg} - \omega_2))(\mu_{ge} \cdot \mathcal{E}_1^*(\omega_{ge} - \omega_1))}{(\Omega_3 - \xi_{e'g})(\Omega_1 - \xi_{ge})} \quad (15)$$

$$S_{\mathbf{k}_f, \text{ESE}}(\Omega_3, t_2, \Omega_1) = -\left(\frac{1}{\hbar}\right)^3 \sum_{e'e} \exp(-i\xi_{e'e} t_2) \frac{(\mu_{ge'} \cdot \mathcal{E}_s^*(\omega_s - \omega_{e'g}))(\mu_{e'g} \cdot \mathcal{E}_3(\omega_{e'g} - \omega_3))(\mu_{e'g} \cdot \mathcal{E}_2(\omega_{e'g} - \omega_2))(\mu_{ge} \cdot \mathcal{E}_1^*(\omega_{ge} - \omega_1))}{(\Omega_3 - \xi_{e'g})(\Omega_1 - \xi_{ge})} \quad (16)$$

$$S_{\mathbf{k}_f, \text{ESA}}(\Omega_3, t_2, \Omega_1) = -\left(\frac{1}{\hbar}\right)^3 \sum_{f'e} \exp(-i\xi_{e'e} t_2) \frac{(\mu_{ef} \cdot \mathcal{E}_s^*(\omega_s - \omega_{fe}))(\mu_{fe} \cdot \mathcal{E}_3(\omega_{fe} - \omega_3))(\mu_{e'g} \cdot \mathcal{E}_2(\omega_{e'g} - \omega_2))(\mu_{ge} \cdot \mathcal{E}_1^*(\omega_{ge} - \omega_1))}{(\Omega_3 - \xi_{fe})(\Omega_1 - \xi_{ge})} \quad (17)$$

#### 4.1. Simulation von 2DIR-Spektren kleiner Peptide mittels Gauß'scher Frequenzfluktuationen

Wir wenden uns jetzt einer speziellen Klasse von Fluktuationsmodellen zu,<sup>[55,62]</sup> die exakt gelöst werden können und kompakte, geschlossene Ausdrücke für die Antwortfunktionen liefern. Die 2DIR-Signale kleiner Peptide mit weniger als 30 Resten konnten auf diese Weise modelliert werden.

Wir nehmen zunächst an, dass rein diagonale Energiefluktuationen bestehen, die der Gauß-Statistik unterliegen und die klein sind im Vergleich zum Abstand zwischen den Energieniveaus. Dies ist gegeben, wenn die Energien durch kollektive Koordinaten moduliert werden, die sich als Summe harmonischer Koordinaten ausdrücken lassen. Allerdings ist das Modell auch breiter gültig, wenn die kollektiven Koordinaten durch eine Summe von Badkoordinaten beschrieben werden können, von denen jede einen kleinen Beitrag liefert. Ein wichtiges Beispiel ist die Marcus-Theorie des Elektronentransfers,<sup>[177]</sup> bei der die kollektive Koordinate dem elektrischen Feld an einer gegebenen Stelle entspricht, das durch die Summe der umgebenden Ladungen gegeben ist. Mit der Condon-Näherung können wir zudem Fluktuationen in der Größe des Übergangsdipols vernachlässigen.

Die Antwortfunktionen können durch Kumulantenentwicklung zweiter Ordnung exakt berechnet werden. Zu diesem Zweck definieren wir  $U_{ma}(t) \equiv \omega_{ma}(t) - \bar{\omega}_{ma}$ , um damit die Fluktuationen der Übergangsfrequenzen zu beschreiben, wobei  $\bar{\omega}_{ma}$  die mittlere Übergangsfrequenz ist. Die Korrelationsfunktion  $U$  für zwei Zeiten ist durch Gleichung (18) gegeben.  $C'(t)$  und  $C''(t)$  sind darin die realen bzw. imaginären Anteile von  $C$  und  $\tau_{12} = \tau_1 - \tau_2$ . Unter Verwendung der Fluktuations-Dissipations-Beziehung zwischen  $C'$  und  $C''$  definieren wir ferner die Linienverbreiterungsfunktionen als Gleichung (19).  $g_{mn}(t)$  kann durch Gleichung (20) ausgedrückt werden, wobei  $C'_{mn}(\omega)$ , die spektrale Dichte, durch Gleichung (21) definiert ist. Die realen und imaginären Anteile von  $g_{mn}(t)$  verursachen die Linienverbreiterung bzw. die Spektralverschiebung. Die nichtlineare Antwortfunktion dritter Ordnung kann in Termen von  $g(t)$  ausgedrückt werden.<sup>[66]</sup> Wir bezeichnen dieses Modell als Kumulantenentwicklung von Gauß'schen Fluktuationen (CGF; Cumulant expansion of Gaussian fluctuations).

In Abbildung 11 sind simulierte  $\mathbf{k}_f$ - und  $\mathbf{k}_{ff}$ -Signale aller Amidbanden von *N*-Methylacetamid (NMA) in Wasser in der Kreuzsignalregion dargestellt. Die Simulationen geben die in

$$C_{mn}(\tau_1, \tau_2) = \frac{1}{\hbar^2} \langle U_{ma}(\tau_1) U_{na}(\tau_2) \rangle \quad (18)$$

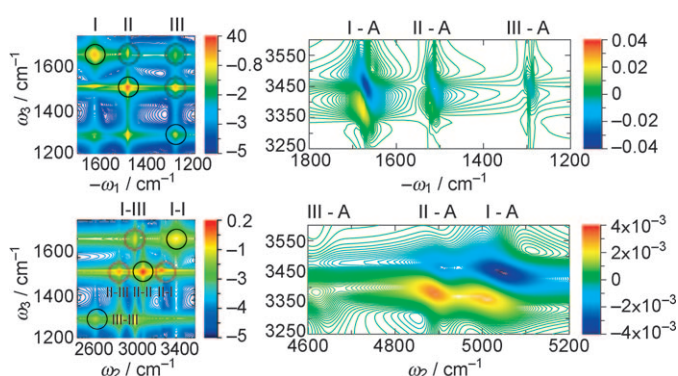
$$\equiv C'(\tau_{12}) + iC''(\tau_{12})$$

$$g_{mn}(t) = \int_0^t d\tau_1 \int_0^{\tau_1} d\tau_2 C_{mn}(\tau_1) \quad (19)$$

$$g_{mn}(t) = \int_{-\infty}^{\infty} \frac{d\omega}{2\pi} \frac{1 - \cos(\omega t)}{\omega^2} \coth\left(\frac{\hbar\omega}{2k_B T}\right) C_{mn}''(\omega) \quad (20)$$

$$+ i \int_{-\infty}^{\infty} \frac{d\omega}{2\pi} \frac{\sin(\omega t) - \omega t}{\omega^2} C_{mn}''(\omega)$$

$$C_{mn}''(\omega) = 2 \int_0^{\infty} dt \sin(\omega t) C_{mn}''(t) \quad (21)$$



**Abbildung 11.** 2D-Signale für ein Modellsystem einer Peptidbindung (NMA) in der Kreuzsignalregion der Amidbanden I, II, III und A. Linke obere Tafel:  $\text{Im}[S_k(-\Omega_1, t_2=0, \Omega_3)]$  in der Kreuzsignalregion der Amidbanden I-III; linke untere Tafel:  $\text{Im}[S_k(t_1=0, \Omega_2, \Omega_3)]$  in der Kreuzsignalregion der Amidbanden I-III. Die rechten Tafeln zeigen die gleichen Signale in der Kreuzsignalregionen der Amidbande A mit den Amidbanden I-III.

kürzlichen Kreuzsignalexperimenten erhaltenen Anharmonizitäten der Amid-I- und Amid-II-Banden gut wieder (berechnet:  $14 \text{ cm}^{-1}$  bzw.  $13 \text{ cm}^{-1}$ ; exp.:  $12 \text{ cm}^{-1}$  bzw.  $10 \text{ cm}^{-1}$ ).

Die Frequenz-Frequenz-Korrelationsfunktion zweier Schwingungsübergänge [Gl. (18)] lässt sich mit Gleichung (22) ausdrücken:

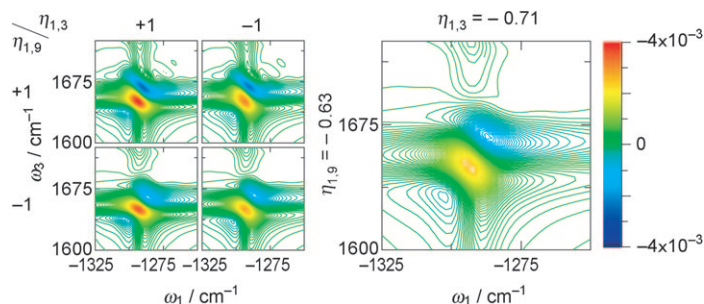
$\Delta_{mn} \equiv \sqrt{\langle U_{ma}^2 \rangle}$  ist die Fluktuationsamplitude,  $\bar{C}_{mn}$  die normalisierte Korrelationsfunktion ( $\bar{C}_{mn}(0) = 1$ ) und  $\eta_{mn} \equiv \langle U_{ma} U_{na} \rangle / \sqrt{\langle U_{ma}^2 \rangle \langle U_{na}^2 \rangle}$  der Korrelationskoeffizient, der von 1 (volle Korrelation) über 0 (keine Korrelation) bis  $-1$  (Antikorrelation) läuft.

$$C_{mn}(t) = \eta_{mn} \Delta_{mn} \Delta_{nn} \bar{C}_{mn}(t) \quad (22)$$

Um zu demonstrieren, wie empfindlich kohärente Infrarotsignale von den korrelierten Frequenzfluktuationen ab-

hängen, sind in Abbildung 12 die Photonenecho-Kreuzsignale der Amidbanden I-III von NMA,  $\text{Im}[S_k(\Omega_1, t_2=0, \Omega_3)]$ , für verschiedene Kombinationen von Korrelationskoeffizienten  $\eta_{mn}$  dargestellt. Negative und positive Anteile des Signals entsprechen den ESA- bzw. ESE/GSB-Pfaden in Abbildung 10. Korrelationen zwischen der Amid-I- und Amid-III-Bande ( $\eta_{13}$ ) verursachen die negative Komponente und Korrelationen zwischen der Amid-III-Bande und der Kombinationsbande I + III ( $\eta_{19}$ ) die positive Komponente. Das negative Signal wird schwächer und breiter, wenn  $\eta_{13}$  von  $+1$  nach  $-1$  läuft, es hängt aber unsignifikant von  $\eta_{19}$  ab. Das positive Signal wird kleiner und mehr in  $\Omega_3$ -Richtung verbreitert, wenn  $\eta_{19}$  von der vollen Korrelation ( $+1$ ) in die Antikorrelation ( $-1$ ) läuft. Die effektiven simulierten Werte (antikorreliertes  $\eta_{13} = -0.71$  und korreliertes  $\eta_{19} = 0.63$ ) ergeben schwächere Signale als im voll korrelierten Fall.

Bei Systemen mit mehreren lokalen Minima, deren Dynamik in gut separierte Zeitregimes unterteilt werden kann, können wir das inhomogene CGF-Protokoll anwenden.<sup>[76]</sup> Die Spektren werden erhalten, indem man die Beiträge der sich langsam ineinander umwandelnden Konfigurationen, die jeweils durch ihre CGF beschrieben werden, aufsummiert. Das Protokoll wurde z. B. zur Simulation der Amid-I-Region des Tryptophan-Zipper-Peptids Trpzip2 mit  $\beta$ -Haarnadelkonformation und seines  $^{13}\text{C}$ -Isotopomers verwendet. Das  $\beta$ -Haarnadelmotiv ist ein häufiges Strukturelement von Proteinen und dient als wichtiges Modellsystem für die Faltungskinetik größerer Proteine. Insbesondere das Trpzip-Motiv bewirkt eine starke Stabilisierung der  $\beta$ -Haarnadelkonformation in kurzen Peptiden ( $12\text{--}16 \text{ \AA}$  Länge). Die Trpzip-Peptide sind die kleinsten Peptide, die ohne Anbindung von Metallen, ungewöhnlichen Aminosäuren oder Disulfidbrücken eine tertiäre Faltung einnehmen. 500 Momentaufnahmen in Zeitintervallen von 2 ps aus einer Trajektorie von 1 ns wurden für eine inhomogene Mittelung verwendet, wobei zusätzlich eine homogene Phasenkopplungsrate  $\gamma$  von  $5.5 \text{ cm}^{-1}$  eingesetzt wurde.<sup>[178]</sup> Zwei



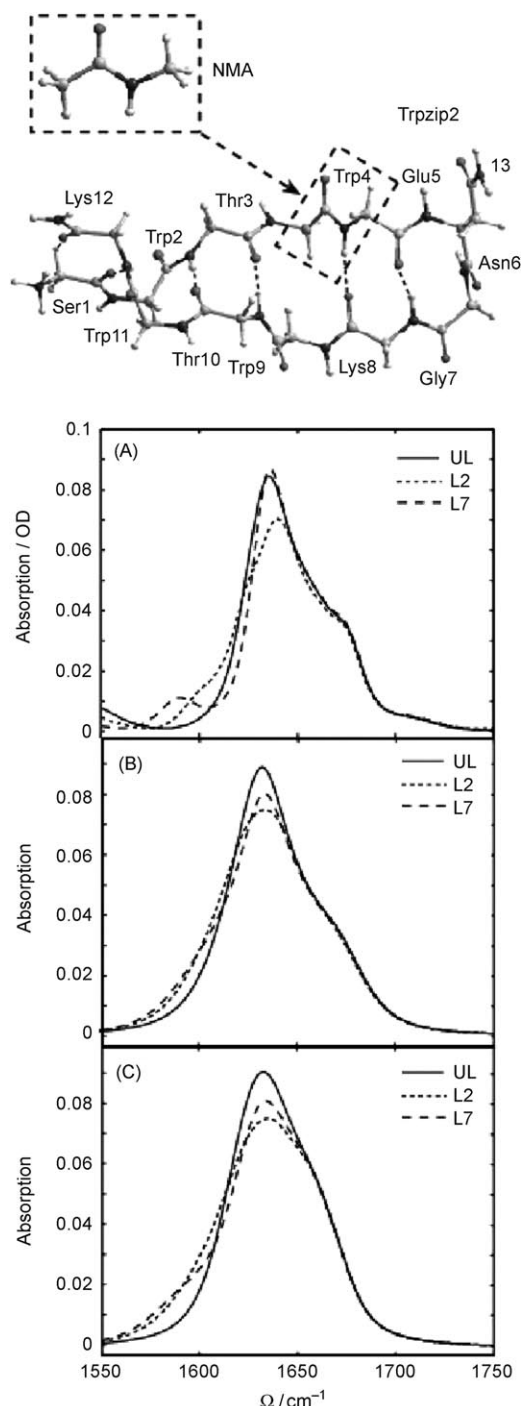
**Abbildung 12.**  $k_F$ -Kreuzsignale der Amidbanden I-III für unterschiedliche Korrelationskoeffizienten. Linke Tafeln:  $\text{Im}[S_k(\Omega_1, t_2=0, \Omega_3)]$ -Signale für unterschiedliche Werte von  $\eta_{1,3}$  und  $\eta_{1,9}$ ; rechte Tafel: die effektiven simulierten Signale.

elektrostatische Konturkarten (HC<sup>[158]</sup> und HM,<sup>[142]</sup> siehe Abschnitt 3) wurden genutzt, um die Frequenzen der lokalen Moden in der Lösungsphase zu berechnen. Spektren nicht-markierter Proben (UL; unlabeled) und von Proben mit  $^{13}\text{C}$ -Markierungen an bestimmten Positionen wurden berechnet.

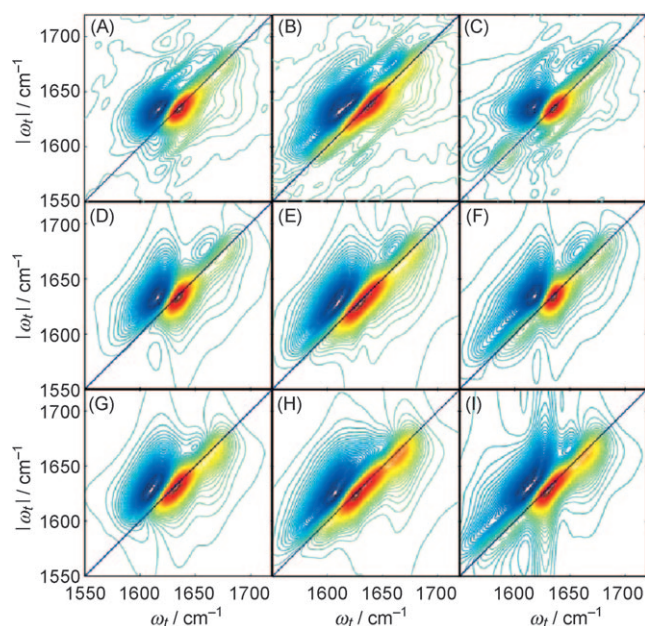


In Abbildung 13 und 14 sind simulierte und experimentell erhaltene Signale gegenübergestellt. Das Peptid L2 enthält einen markierten  $\beta$ -Strang (zweiter Rest), das Peptid L7 einen markierten Turn (siebter Rest).

Die experimentellen Absorptionsspektren der  $^{13}\text{C}$ -Isotopomere von Trpzip2 in Abbildung 13 lassen zwei Hauptübergänge erkennen: einen intensiven niederfrequenten



**Abbildung 13.** IR-Spektren einiger  $^{13}\text{C}$ -Isotopomere von Trpzip2. Durchgezogene Linien: UL; gestrichelte Linien: L2; gepunktete Linien: L7. A) Experimentelle Daten, B) elektrostatisches HC-Potentialmodell,<sup>[158]</sup> C) HM-Multipolefeldmodell.<sup>[142]</sup>



**Abbildung 14.** A–C) Experimentelle  $\mathbf{k}_t + \mathbf{k}_r$ -Spektren von  $^{13}\text{C}$ -Isotopomeren von Trpzip2. D–F) Simulationen mit dem HC-Hamilton-Operator;<sup>[158]</sup> G–I) Simulationen mit dem HM-Hamilton-Operator.<sup>[142]</sup> Links: UL; Mitte: L2; rechts: L7.  $\omega_t$  ist  $\Omega_1$  in der hier verwendeten Notation, und  $\omega_t'$  ist  $\Omega_3$ .

Übergang bei  $1640\text{ cm}^{-1}$ , der phasengleichen C=O-Bewegungen zwischen den Ketten und phasenversetzten C=O-Bewegungen innerhalb der Ketten zugeschrieben wird, und einen hochfrequenten Übergang bei  $1675\text{ cm}^{-1}$ , der vor allem von phasenversetzten C=O-Bewegungen zwischen den Ketten und phasengleichen C=O-Bewegungen innerhalb der Ketten stammt. Die beiden Isotopomere zeigen unterschiedliche  $^{13}\text{C}$ -Effekte: Die  $^{13}\text{C}$ -Bande ist in L7 um  $10\text{ cm}^{-1}$  weiter rotverschoben als in L2 ( $1590$  bzw.  $1600\text{ cm}^{-1}$ ). Simulierte Spektren sind in den Tafeln B (HC-Hamilton-Operator) und C (HM-Hamilton-Operator) gezeigt. Beide Modelle reproduzieren die wesentlichen spektralen Charakteristika der Haarnadelstruktur, doch ist die Hochfrequenzkomponente im HM-Fall etwas stärker ausgeprägt. Beide Verfahren sagen eine kleine Differenz der  $^{13}\text{C}$ -Verschiebungen von L2 und L7 vorher, die bei der HM-Simulation etwas größer ist.

Die obere Reihe in Abbildung 14 zeigt die experimentellen  $\mathbf{k}_t + \mathbf{k}_r$ -Spektren der  $^{13}\text{C}$ -Isotopomere von Trpzip2. In Tafel A stammen die Diagonalsignale von 0-1- (rot) und 1-2-Übergängen (blau). Die beiden 0-1-Fundamentalfrequenzen stimmen mit der experimentellen Absorption überein, wie die Projektion der 2D-Spektren auf die  $\Omega$ -Achse zeigt. Die Kreuzsignale werden durch paarweise vibronische Kopplungen entlang der Amid-I-Moden hervorgerufen. Wie in den Tafeln (B) und (C) gezeigt, ändern sich die diagonalen und nicht-diagonalen Kreuzsignale bei  $^{13}\text{C}$ -Markierung. Die mittlere Reihe zeigt die Simulationen mit dem HC-Modell und die untere Reihe die Simulationen mit dem HM-Modell. Beide Modelle reproduzieren die wesentlichen Charakteristika der 2DIR-Spektren von UL, L2 und L7.



Der Effekt der nicht-adiabatischen Kreuzung zwischen Amid-I-Hyperflächen, der in diesen Simulationen vernachlässigt wurde, wurde in einer kürzlichen Studie untersucht.<sup>[179]</sup>

## 5. Spektrale Diffusion und chemischer Austausch. Die stochastischen Liouville-Gleichungen

Die im vorigen Abschnitt eingeführten Kumulantenansätze liefern eine einfache und kompakte Beschreibung der Badfluktuationen mit linear an die Frequenzen gekoppelter Gauß-Statistik. Eine allgemeinere Behandlung von Fluktuationen erfordert die Betrachtung eines erweiterten Phasenraums, der die relevanten kollektiven Moden des Umgebungsbads mit einschließt, sowie die Entwicklung der Verteilungsfunktionen in diesem expandierten Raum. Dies kann mithilfe der von Kubo<sup>[180–183]</sup> eingeführten stochastischen Liouville-Gleichungen (SLEs; stochastic Liouville equations) erreicht werden. Die SLEs beschreiben die Dynamik der Verteilung eines Quantensystems bei einer Störung durch einen stochastischen Prozess (der wiederum durch eine Markow-Gleichung beschrieben wird). SLEs finden breite Anwendung bei der Simulation von ESR-,<sup>[184,185]</sup> NMR-<sup>[183]</sup> und IR-Spektren.<sup>[186,187]</sup>

Im Folgenden zeigen wir die Anwendung dieser Methode zur Simulation der 2DIR-Spektren und der chemischen Austauschprozesse eines kleinen Peptids (Trialanin).<sup>[188]</sup> Trialanin hat zwei Amidbindungen, die zur Amid-I-Bande beitragen. Der Hamilton-Operator hängt von den Frequenzen  $\omega_a$  und  $\omega_b$ , den Anharmonizitäten  $K_a$  und  $K_b$  und der Kopplungskonstante  $J$  der beiden lokalisierten Moden ab. Die unten dargestellten Simulationen schließen sechs Schwingungsenergiezustände ein: den Grundzustand ( $g$ ), zwei einfach angeregte Niveaus ( $e_1$  und  $e_2$ ) und drei doppelt angeregte Niveaus ( $f_1$ ,  $f_2$  und  $f_3$ ) (siehe Abbildung 9 in Abschnitt 4). Die Zeitentwicklung der Dichtematrix dieses Zwei-Moden-Systems kann durch die Liouville-Gleichung (23) beschrieben werden.

$$\frac{\partial}{\partial t}\rho(t) = -\frac{i}{\hbar}\mathbf{L}(t)\rho(t) - \frac{i}{\hbar}\mathbf{L}_{\text{int}}(t)\rho(t) \quad (23)$$

$\mathbf{L}(t)\rho(t) = -i\hbar[H_0(t),\rho(t)]$  beschreibt das isolierte System, während  $\mathbf{L}_{\text{int}}(t)\rho(t) = -i\hbar[H_{\text{int}}(t),\rho(t)]$  für die Kopplung mit dem Strahlungsfeld steht.

Eine Analyse der Amid-I-Bande von Trialanin<sup>[100,189–191]</sup> lässt erkennen, dass das Tripeptid primär in der Polyglycin-II-Struktur ( $P_{\text{II}}$ ) mit Ramachandran-Winkeln von  $(\psi,\phi) = (-60^\circ, +140^\circ)$  sowie als rechtsgängige  $\alpha$ -Helix ( $\alpha_R$ ) mit  $(\psi,\phi) = (-60^\circ, +45^\circ)$  vorliegt.<sup>[192]</sup> Durch Trajektorienanalyse der kombinierten Verteilungen von Ramachandran-Winkeln fanden wir 70 %  $P_{\text{II}}$ -Konfiguration und 30 %  $\alpha_R$ , wobei für jede Konfiguration die Verteilungsfunktion der Ramachandran-Winkel durch eine Gauß-Funktion approximiert wurde. Die beiden Konfigurationen sind stabil, und während einer Simulation über 10 ns erfolgten nur 38 Umwandlungen. Dies

entspricht einer Austauschperiode der beiden Spezies im Bereich einiger Hundert Pikosekunden, was zu langsam ist, um signifikant zur 2DIR-Signalform beizutragen. Das Antwortsignal wurde daher als gewichtetes Mittel beider Spezies berechnet. Auch nicht-adiabatische Übergänge zwischen den beiden Zuständen wurden in diesem Zusammenhang untersucht.<sup>[179]</sup>

Die Frequenzfluktuationen der beiden Moden ( $\delta\omega_a$ ) und ( $\delta\omega_b$ ) lassen sich als unabhängige stochastische Variablen behandeln, wobei die Wechselwirkungen der solvatisierenden Wassermoleküle in der unmittelbaren Umgebung der Amid-einheiten dominant eingehen. Die Brown'schen Oszillatorparameter (Relaxationszeiten  $\gamma_a^{-1} = \gamma_b^{-1} = 220$  fs und Intensitäten  $\Delta_a = \Delta_b = 16.1$  cm<sup>-1</sup>) geben die experimentelle Signalform der isolierten Amid-I-Banden in NMA gut wieder.<sup>[159]</sup> Die Fundamentalfrequenzen sind  $\omega_a = \langle\omega_a\rangle + \delta\omega_a$  und  $\omega_b = \langle\omega_b\rangle + \delta\omega_b$  mit mittleren Frequenzen von  $\langle\omega_a\rangle = 1652$  und  $\langle\omega_b\rangle = 1668$  cm<sup>-1</sup>.<sup>[189,190]</sup> Der Unterschied rührt von der Ladung der terminalen Aminogruppe her; die Amidgruppe, die der Säuregruppe am nächsten steht, hat die niedrigere Frequenz.

Fluktuationen der Ramachandran-Winkel ( $\delta\phi$  und  $\delta\psi$ ), die vor allem die Kopplungen  $J$  zwischen den Moden beeinflussen, erfordern einen weiteren Satz an stochastischen Variablen. Die quadratische Entwicklung von  $J$  liefert Gleichung (24).

$$J(\delta\phi, \delta\psi) = \sum_{i=0}^2 \sum_{j=0}^2 C_{ij} \delta\phi^i \delta\psi^j \quad (24)$$

$C_{ij}$  wurde durch Anpassung an die TT-Konturkarte erhalten, die die Kopplungskonstanten mit den Ramachandran-Winkeln verknüpft.<sup>[146]</sup>  $C_{00}$  beschreibt die Kopplung bei gemittelten Ramachandran-Winkeln und dient als Referenzpunkt für die Reihenentwicklung. Wir erhielten  $C_{00} = 4$  cm<sup>-1</sup> für die  $P_{\text{II}}$ -Konfiguration und  $C_{00} = 10.5$  cm<sup>-1</sup> für  $\alpha_R$ .

Alle vier stochastischen Variablen ( $\delta\omega_a$ ,  $\delta\omega_b$ ,  $\delta\phi$  und  $\delta\psi$ ) lassen sich als Brown'sche Oszillatoren betrachten, von denen jeder durch zwei Parameter – die Varianz der Fluktuation  $\Delta$  und die zugehörige Relaxationszeit  $\gamma$  – charakterisiert wird. Die lokalen Anharmonizitäten, die als die Differenzen zwischen der Verdopplung der Fundamentalschwingungen und den Obertönen definiert sind, wurden auf einen Wert von 16 cm<sup>-1</sup> gesetzt (Fluktuationen der lokalen Anharmonizitäten wurden also vernachlässigt).<sup>[53,98,193]</sup> Fluktuationen des Übergangsdipolmoments der lokalen Moden wurden ebenfalls vernachlässigt, und ihr Wert wurde auf eins gesetzt.

Die Wahrscheinlichkeitsverteilung  $P(\mathbf{Q},t)$  der stochastischen Variablen  $Q_1 = \delta\omega_a$ ,  $Q_2 = \delta\omega_b$ ,  $Q_3 = \delta\phi$  und  $Q_4 = \delta\psi$  wird durch die Markow-Gleichung (25) modelliert, wobei  $\Gamma(\mathbf{Q})$  die Smoluchowski-Form [Gl. (26)] für einen stark gedämpften Brown'schen Oszillator annimmt.

$$\frac{\partial P(\mathbf{Q},t)}{\partial t} = -\Gamma(\mathbf{Q})P(\mathbf{Q},t) \quad (25)$$

$$\frac{\partial P(\mathbf{Q}, t)}{\partial t} = - \sum_{j=1}^4 \gamma_j \frac{\partial}{\partial Q_j} \left( Q_j + \Delta_j^2 \frac{\partial}{\partial Q_j} \right) P(\mathbf{Q}, t) \quad (26)$$

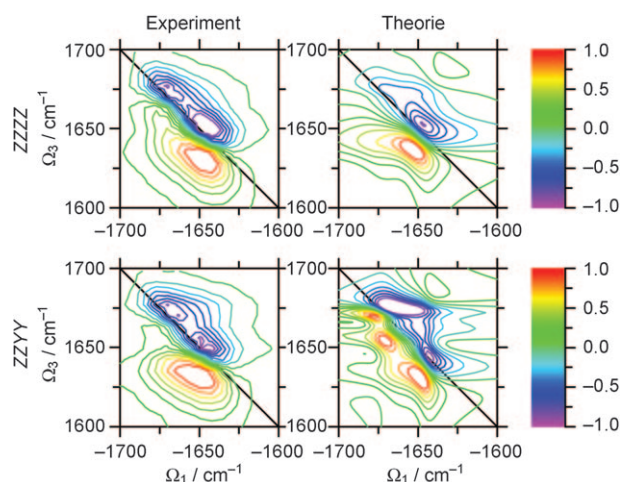
Die stochastische Liouville-Gleichung wird schließlich durch Kombination der Liouville-Gleichung für das Exciton-System [Gl. (23)] mit der Markow-Gleichung (25) für die vier kollektiven Koordinaten der Brown'schen Oszillatoren erhalten [Gl. (27)].

$$\dot{\rho}(\mathbf{Q}, t) = -\frac{i}{\hbar} \mathbf{L}(\mathbf{Q}) \rho(\mathbf{Q}, t) - \Gamma(\mathbf{Q}) \rho(\mathbf{Q}, t) \quad (27)$$

Die stochastische Liouville-Gleichung kann durch Darstellung der Green-Funktion in einer Kettenbruchmatrix der Frequenzdomäne gelöst werden.<sup>[188]</sup> Das 2DIR-Photonenechosignal  $S_{\mathbf{k}_i}(\Omega_1, t_2, \Omega_3)$  wurde durch Rücktransformation der Frequenz  $\Omega_2$  in die Zeitdomäne erhalten [Gl. (28)].

$$S_{\mathbf{k}_i}(\Omega_1, t_2, \Omega_3) = \text{Im} \int_{-\infty}^{\infty} d\Omega_2 R_{\mathbf{k}_i}(\Omega_1, \Omega_2, \Omega_3) \exp(-i(\Omega_2 t_2)) \quad (28)$$

Die Green-Funktion des Zeitintervalls  $t_2$  kann auch in der Zeitdomäne durch eine direkte Zeitintegration der SLE berechnet werden. Für das gesamtparallele Signal zzzz werden in Lit. [194] verschiedene Simulationsverfahren verglichen. Das höchste Theorieniveau berücksichtigt die Fluktuationen aller vier Badkoordinaten. Der Liouville-Operator wird auf lokaler Basis aufgestellt, und die Kopplung zwischen den lokalen Moden fluktuiert mit den Ramachandran-Winkeln. Wie Abbildung 15 zeigt, wird eine zufriedenstellende Übereinstimmung mit dem Experiment erhalten. Einige Unter-

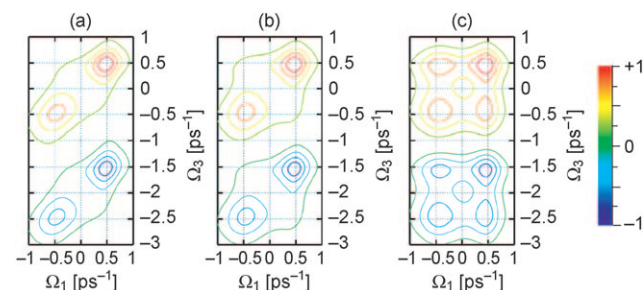


**Abbildung 15.** Oben: Experimentelles  $\mathbf{k}_i$ -Photonenechospektrum von Trialanin<sup>[194]</sup> (links) und das simulierte Spektrum (rechts) für parallel polarisierte Pulse. Unten: entsprechender Vergleich für senkrecht polarisierte Pulse. Die Spektren sind auf die intensivsten Signale normalisiert.

schiede ergeben sich aus der Überschätzung der  $\alpha_R$ -Population in der MD-Simulation. Stock et al.<sup>[195]</sup> konnten zeigen, dass unterschiedliche MD-Kraftfelder deutlich verschiedene Populationen der Konformere von Trialanin vorhersagen. Es besteht aber die Möglichkeit, die SLEs auch aus Parametern von NMR-Experimenten herzuleiten.

Zusammenfassend genügen vier kollektive Koordinaten, um den Einfluss von Fluktuationen auf die zwei Amid-I-Banden von Trialanin zu beschreiben, wobei Fluktuationen der Ramachandran-Winkel signifikante Auswirkungen auf die 2DIR-Signalförmigkeiten nicht-starrer Peptide haben.

Die gegenseitige Umwandlung der Konformere von Trialanin („Austausch“) ist langsam, und das Signal lässt sich als gewichtete Summe der Beiträge der einzelnen Konformere beschreiben. Schnellere Austauschprozesse, z. B. Wasserstoffbrücken- und Isomerisierungsdynamiken, führen zu interessanten spektralen Merkmalen.<sup>[196]</sup> Solche Prozesse können durch Einbeziehung von Mehrzustandssprüngen in die SLE berücksichtigt werden. Bewegungen Brown'scher Oszillatoren und Austauschprozesse lassen sich anhand ihrer 2DIR-Signaturen unterscheiden. In den folgenden Simulationen haben wir unterschiedliche Breiten der u- und d-Banden zugelassen. Die Aufspaltung  $2\Delta_0 = 34 \text{ cm}^{-1}$  (d. h.  $1.01 \text{ ps}^{-1}$ ) und die Austauschgeschwindigkeiten  $k_u = 0.1 \text{ ps}^{-1}$  und  $k_d = 0.125 \text{ ps}^{-1}$  wurden aus dem Anstieg der Kreuzsignale nach Lit. [136] bestimmt. Alle drei Zeitregimes wurden am Beispiel der Bildung und der Dissoziation von Phenol-Benzol-Komplexen in  $\text{CCl}_4$  experimentell verfolgt.<sup>[136]</sup> Im mittleren Bereich der Zeitskala (2 ps) ist das „Gedächtnis“ an die Koordinate der Brown'schen Oszillatoren erloschen, wie die konzentrischen Signalförmigkeiten belegen. Wir haben daher eine Relaxationsgeschwindigkeit von  $\Lambda \approx 0.4 \text{ ps}^{-1}$  angenommen. Die Variablen  $\Lambda$ ,  $\Omega_1$  und  $\Omega_3$  können aus den Linienbreiten mithilfe der Pade-Näherung eines Zweizustandssystems erhalten werden.<sup>[66]</sup> Mit den Werten  $\Omega_1 = 0.33 \text{ ps}^{-1}$  und  $\Omega_3 = -0.07 \text{ ps}^{-1}$  können die Simulationen die experimentellen Absorptionsspektren reproduzieren. Die 2DIR-Photonenechosignale in Abbildung 16 geben sämtliche experimentellen Kenndaten wieder, und alle drei Signalregimes sind deutlich zu sehen: a) elliptische Formen beim Phasenausgleich, b) der relaxierte Brown'sche Oszillator mit konzentrischer Form und c) Kreuzsignale für chemischen Austausch (das niederfrequente Signal ist schwächer und breiter).<sup>[136]</sup>



**Abbildung 16.** Simulierte 2DIR-Signale  $S_A = k_i + k_j$  mit  $\Omega_1 = 0.5 \text{ fs}^{-1}$ ,  $\Lambda = 0.4 \text{ ps}^{-1}$ ,  $\Omega_2 = 0.33 \text{ ps}^{-1}$ ,  $\Omega_3 = -0.07 \text{ ps}^{-1}$ ,  $k_d = 0.125 \text{ ps}^{-1}$ ,  $k_u = 0.1 \text{ ps}^{-1}$ ,  $\Delta_0 = -2.0 \text{ ps}^{-1}$ ,  $\Delta_3 = \Delta_1 = 0$ . Die Totzeiten betragen: a)  $t_2 = 0$ , b)  $t_2 = 2 \text{ ps}$ , c)  $t_2 = 10 \text{ ps}$ . Die Spektren geben die experimentellen Befunde in Lit. [136] sehr gut wieder.

Die stochastische Liouville-Gleichung kann auf viele Arten von Fluktuationen aller Elemente des Hamilton-Operators angewendet werden. Die einzige Voraussetzung ist, dass sich das Element durch (diskrete oder kontinuierliche) kollektive Koordinaten darstellen lässt, die eine der Markow-Bewegungsgleichungen erfüllen. Die Markow-Gleichungen berücksichtigen den Effekt der Fluktuationen kollektiver Badkoordinaten auf nichtlineare IR-Spektren, indem sie das kombinierte System aus Probe und Umgebungsbad entwickeln.

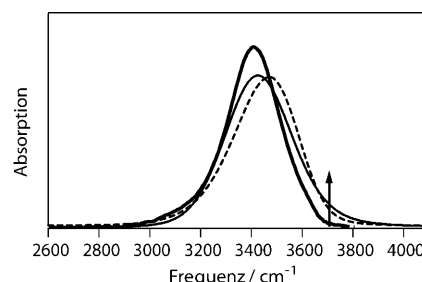
## 6. Die O-H-Streckschwingung von flüssigem Wasser

Flüssiges Wasser hat viele einzigartige Eigenschaften, die auf seiner ungewöhnlichen Fähigkeit zur Bildung von Wasserstoffbrücken beruhen. Die Fluktuation von Wasserstoffbrücken wurde intensiv studiert.<sup>[92,121,175,197–206]</sup>

Die Bande der O-H-Streckschwingung wird durch resonanten Excitonentransfer auf benachbarte Moleküle verkompliziert.<sup>[175,204,207–210]</sup> Das Spektrum von HOD in D<sub>2</sub>O wird oft als einfacheres Modellsystem genutzt, da ein solcher Excitonentransfer hier nicht möglich ist (die O-H-Frequenz von 3400 cm<sup>-1</sup> liegt deutlich über der O-D-Frequenz bei 2500 cm<sup>-1</sup>).<sup>[211]</sup> Die Bandenbreite der O-H-Streckschwingung in HOD/D<sub>2</sub>O<sup>[120,212,213]</sup> beträgt 255 cm<sup>-1</sup> (FWHM),<sup>[212]</sup> und die Bande ist im Vergleich zur Gasphasenfrequenz von 3707.47 cm<sup>-1</sup><sup>[214]</sup> um 307 cm<sup>-1</sup><sup>[212]</sup> rotverschoben. Woutersen und Bakker fanden eine Stokes-Verschiebung der Infrarotfluoreszenz von 70 cm<sup>-1</sup>.<sup>[215–219]</sup> Die Dynamik der Schwingungsrelaxation und der Wasserstoffbrücken wurde auch durch spektrale Lochbrennung, Zweiphotonenechoexperimente und Photonenechoverschiebungen untersucht.<sup>[120,213,220,221]</sup> Eine beobachtete Oszillation wurde der kohärenten Bewegung der Wasserstoffbrücken zugeschrieben und durch Simulationen bestätigt.<sup>[120,222]</sup> Ähnliche Photonenecho-Experimente wurden am komplementären System (O-D-Streckschwingung von HOD in H<sub>2</sub>O) durchgeführt.<sup>[122,223]</sup> Kürzlich wurde vorgeschlagen, dass ein nichtlineares IR-Experiment 5. Ordnung (3D-IR)<sup>[224]</sup> die Dreipunkt-Korrelationsfunktion der Frequenzfluktuation abbilden kann, wodurch die Beziehung zwischen den spektroskopischen Koordinaten und den dynamischen Koordinaten der H-Brücken-Umlagerung aufgeklärt werden könnte.<sup>[225]</sup>

Das in Abschnitt 3 beschriebene Protokoll zur Erstellung von elektrostatischen Ab-initio-Konturkarten wurde verwendet, um die Fundamentale der O-H-Streckschwingung und ihren Oberton zu simulieren.<sup>[226]</sup> Das anharmonische Schwingungspotential wurde auf dem MP2/6-31 + G(d,p)-Niveau zur 6. Ordnung in den drei Normalkoordinaten (H-O-D-Biegeschwingung, O-H- und O-D-Streckschwingungen) im elektrischen Multipolfeld entwickelt. Die durch CGF simulierten solvensbedingten Bandenverschiebungen und Bandenbreiten (287 cm<sup>-1</sup> und 309 cm<sup>-1</sup>) stimmen gut mit dem Experiment (306 cm<sup>-1</sup> und 250 cm<sup>-1</sup>) überein (Abbildung 17).

Für die O-H-Streckschwingung wurde eine kollektive elektrostatische Koordinate  $\Omega$  (CEC; collective electrostatic coordinate) eingeführt.  $\Omega$  ist eine Linearkombination von Koeffizienten elektrischer Multipolfelder und ist definiert als



**Abbildung 17.** Simulierte Linienform des linearen IR-Signals der O-H-Schwingung bei Berechnung mit CGF (dünne Linie) und SLE (gestrichelte Linie) sowie experimentelle Daten (dicke Linie).<sup>[120]</sup> Der vertikale schwarze Pfeil markiert die Gasphasenfrequenz.<sup>[214]</sup>

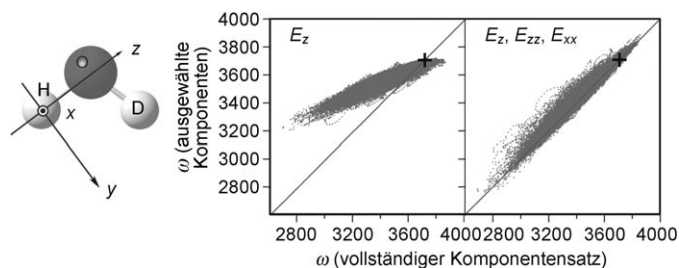
linearer Teil der Frequenzkontur [siehe Gl. (6) in Abschnitt 3.1] in  $\mathbf{C}$  um den Mittelwert  $\langle \mathbf{C} \rangle$  [Gl. (29)]

$$\Omega \approx 189.7 \frac{\text{cm}^{-1} \text{\AA}}{\text{V}} \delta E_z + 77.7 \frac{\text{cm}^{-1} \text{\AA}^2}{\text{V}} \delta E_{xx} - 39.5 \frac{\text{cm}^{-1} \text{\AA}^2}{\text{V}} \delta E_{zz} \quad (29)$$

Wir können das in Abbildung 17 gezeigte Koordinatensystem verwenden. Die Frequenzfluktuationen lassen sich gut durch ein quadratisches Polynom in  $\Omega$  beschreiben [Gl. (30)].

$$\omega \approx \omega_{\text{eq}} + \Omega + \frac{\kappa}{\omega_{\text{eq}}} \Omega^2 \quad (30)$$

Eine Auftragung der mit selektierten elektrostatischen Komponenten berechneten Frequenzen gegen die Frequenzen bei vollständigem Komponentensatz (Abbildung 18) zeigt, dass drei Komponenten ( $E_z$ ,  $E_{zz}$  und  $E_{xx}$ ) die Frequenzverschiebung zur Gasphase dominieren. Die nur mit  $E_z$  berechneten Frequenzen (linke Tafel) sind systematisch zu groß, was auf signifikante Beiträge von  $E_{xx}$  und  $E_{zz}$  zur O-H-Streckschwingungsfrequenz hindeutet.  $E_{xx}$  wird von den Wasserstoffbrücken des HOD-Sauerstoffs zum Deuterium des Solvens D<sub>2</sub>O dominiert. Die Partialladung des Deuteriums in D<sub>2</sub>O erzeugt einen diagonalen, negativen Gradienten außerhalb der Ebene des elektrischen Feldes, was die gemit-



**Abbildung 18.** Auftragung der mit ausgewählten elektrostatischen Komponenten berechneten Frequenzen gegen den vollständigen Komponentensatz. Kreuze markieren die Gasphasenfrequenzen.<sup>[214]</sup> Die diagonalen Linien entsprechen perfekter Übereinstimmung. Links  $E_z$ , rechts  $E_z$ ,  $E_{zz}$  und  $E_{xx}$ . Alle Achsen haben die Einheit cm<sup>-1</sup>.

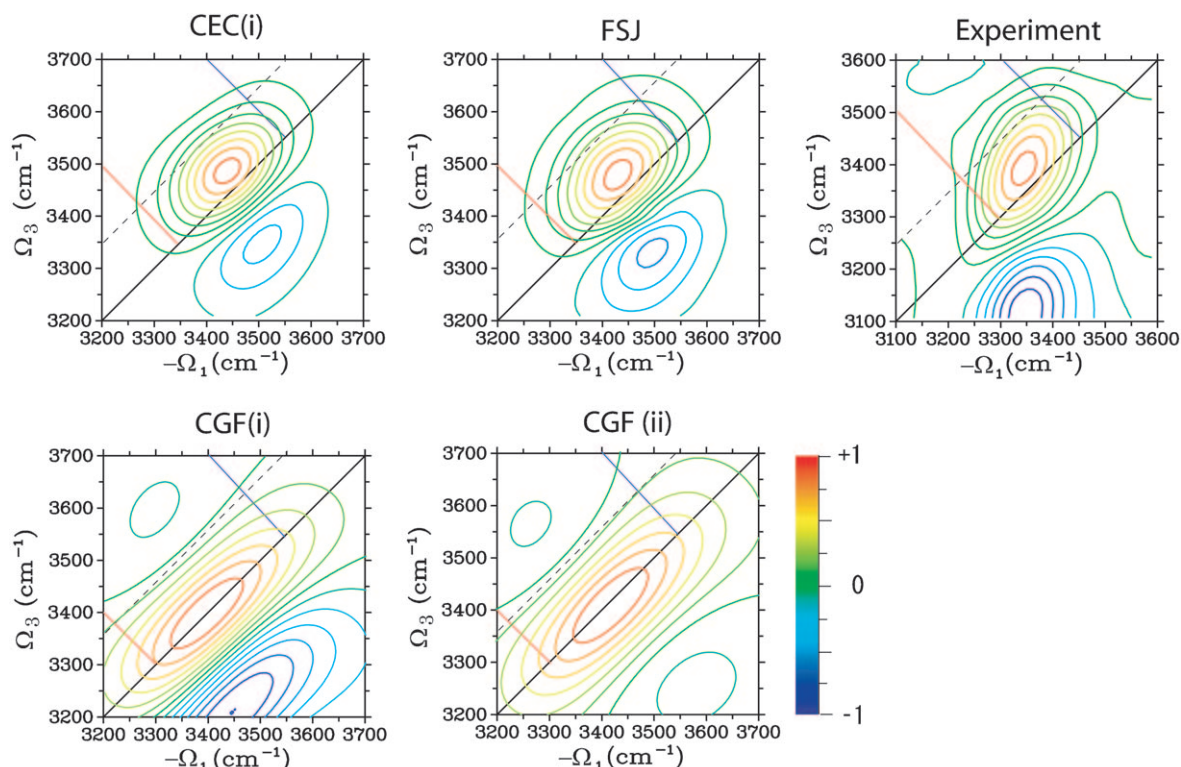


telten Werte  $\langle E_{xx} \rangle$  ( $-0.0094$ ) des simulierten Ensembles bestätigen.

Die Korrelationsfunktion der CEC klingt biexponentiell ab. Die CEC wurde daher in zwei Summanden zerlegt: 1) eine schnelle Koordinate ( $\Omega_1$ ) für den Brown'schen Oszillator, die für die Fluktuationen der Wasserstoffbrücken steht, und 2) eine langsame Koordinate ( $\Omega_2$ ), die die Fluktuationen des Solvens außerhalb der ersten Solvathülle repräsentiert ( $\Omega = \Omega_1 + \Omega_2$ ). Die Relaxationszeiten von  $\Omega_1$  und  $\Omega_2$  betragen  $\tau_1 = 34.4$  fs bzw.  $\tau_2 = 0.501$  ps. Zwei stochastische Modelle – die bereits eingeführte CEC und ein Vierzustandssprung (four-state jump, FSJ) – wurden verwendet, um den Einfluss der H-Brücken-Fluktuationen  $\Omega_1$  auf die Signalform zu simulieren.<sup>[226,227]</sup> Das CEC-Modell geht von zwei CECs ( $\Omega_1$  und  $\Omega_2$ ) aus, die schnelle und langsame Fluktuationen unter der Annahme kontinuierlicher Gauß-Prozesse beschreiben. Das FSJ-Modell verwendet zusätzlich zur langsamen CEC-Fluktuation  $\Omega_2$  eine Master-Gleichung zur Darstellung der Übergänge zwischen vier Konfigurationen von Wasserstoffbrücken. Durch Vorgabe geometrischer Kriterien wurden zwölf Wasserstoffbrückenkonfigurationen erhalten.<sup>[203,228,229]</sup> Diese wurden in vier Gruppen unterteilt: Konfiguration I (eine H-Brücke zu jedem Wasserstoff und zwei zum Sauerstoff), II (eine H-Brücke zu jedem Wasserstoff und weniger als zwei zum Sauerstoff), III (keine H-Brücken zum Wasserstoff, aber zwei zum Sauerstoff) und IV (keine H-Brücken zum Wasserstoff und weniger als zwei zum Sauerstoff).

Während die mit CGF erhaltene Bandenform symmetrisch ist, sagt das CEC-Modell eine asymmetrische Bande mit langer Schleife in den rotverschobenen Bereich voraus, was mit dem Experiment übereinstimmt (Abbildung 17).<sup>[120]</sup> Die antidiagonalen Signalbreiten der Photonenechos bei niedriger und hoher Frequenz werden mit CGF und CEC ähnlich beschrieben (Abbildung 19). Die mit FSJ berechnete Linienbreite ist bei hohen Frequenzen um  $23\text{ cm}^{-1}$  größer, obwohl die Frequenzverteilung der niederfrequenten Konfiguration I breiter ist. Beim in Abbildung 19 gezeigten Experiment ist der blaue Schnitt  $19\text{ cm}^{-1}$  breiter als der rote. Wir definieren den Asymmetrieparameter  $\eta$  als die FWHM-Signalbreiten der roten ( $\Gamma_R$ ) und der blauen ( $\Gamma_B$ ) antidiagonalen Schnitte (Abbildung 19):  $\eta = (\Gamma_B - \Gamma_R)/(\Gamma_B + \Gamma_R)$ . Der FSJ-Asymmetrieparameter  $\eta$  (0.125) (Abbildung 19, obere Reihe, mittlere Tafel) ist in besserer Übereinstimmung mit dem Experiment<sup>[230]</sup> (0.0848) als der CEC-Wert (0.0138) (Abbildung 19, obere Reihe links). Die CGF-Simulation ergibt eine symmetrische Bande entlang der diagonalen schwarzen Linie (Abbildung 19, unten) und verfehlt die beobachtete Asymmetrie.

Der experimentelle Asymmetrieparameter  $\eta$  impliziert, dass die kürzere Lebensdauer der hochfrequenten Wasserstoffbrücken zu einer deutlichen Signalverbreiterung führen. Die Kinetik der Wasserstoffbrückenumlagerungen ist wesentlich schneller als die langsame Dynamik, die zur Frequenzverteilung der verschiedenen Spezies führt. Die dreieckige Form des diagonalen Photonenechos kann der



**Abbildung 19.** Vergleich von simulierten 2DIR-Photonenechospektren, berechnet mit zwei SLE- und zwei CGF-Modellen, mit dem Experiment. Die durchgezogene schwarze Linie ist die Diagonale, die gestrichelte Linie ist von der Diagonalen um  $100\text{ cm}^{-1}$  nach oben versetzt. Die roten und blauen Linien markieren, wo die antidiagonalen Schnitte zur Bestimmung des Asymmetrieparameters  $\eta$  angelegt wurden. CEC(i): SLE-Simulation mit CEC; FSJ: SLE-Simulation mit FSJ; CGF(i): CGF-Simulation; CGF(ii): CGF-Simulation mit infinit negativer Anharmonizität.



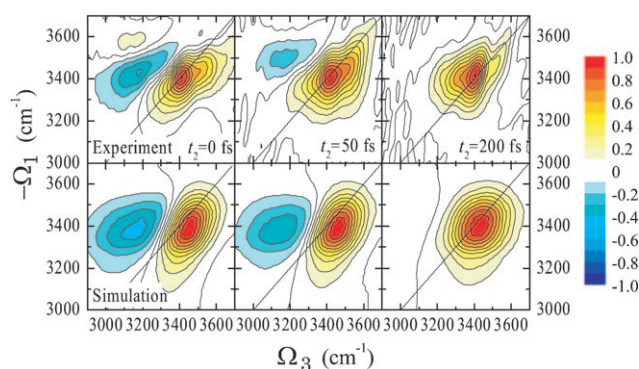
schnellen Femtosekundenkinetik der Wasserstoffbrücken zugeschrieben werden. Im FSJ-Modell beeinflusst der Bruch einer Wasserstoffbrücke zum Sauerstoff die Fundamentele der O-H-Streckschwingung und die Anharmonizität mehr als der Bruch einer H-Brücke zu den Wasserstoffatomen. Die Bildung von Wasserstoffbrücken zum Deuterium führt zu einer Blauverschiebung.

Wir definieren die anharmonische Verschiebung als den Frequenzunterschied entlang der  $\omega_3$ -Achse zwischen den Signalpositionen für die stimulierte Emission und die Ausbleichung des Grundzustands. Anharmonische Fluktuationen tragen  $10\text{ cm}^{-1}$  zur anharmonischen Verschiebung bei. Die Bildung von Wasserstoffbrücken zum H-Atom von HOD verringert das Potential der O-H-Streckschwingung umso stärker, je länger die O-H-Bindung ist, wodurch auch die Anharmonizität größer wird. Die 2DIR-Technik ist eine gute Methode zur Untersuchung von Wasser in räumlich begrenzten Volumina (Membranen, Grenzflächen, inverse Micellen).<sup>[231–233]</sup> Die Signale geradzahlgiger Ordnung  $R^{(2)}$  und  $R^{(4)}$  verschwinden in isotropen Systemen und bieten sich damit als spektrales Merkmal zur Untersuchung von Grenzflächen an.<sup>[234–236]</sup> Die Summenfrequenzerzeugung ist eine 1D-Methode, doch mehrdimensionale Erweiterungen sind in Aussicht.<sup>[237]</sup>

Bei der Simulation der 2DIR-Spektren von reinem flüssigem Wasser ( $\text{H}_2\text{O}$ ) müssen die stark fehlgeordneten, resonant gekoppelten O-H-Streckschwingungen betrachtet werden. Neben Modulationen der Dipolübergangsfrequenzen (die auch im HOD/ $\text{D}_2\text{O}$ -System existieren) und der Anharmonizitäten werden nun auch Fluktuationen der intermolekularen Kopplungen innerhalb des ausgedehnten Netzwerks von H-Brücken relevant. Die ersten Photonenechosstudien an reinem  $\text{H}_2\text{O}$ <sup>[123,175]</sup> zeigten eine im Vergleich zu HOD und  $\text{D}_2\text{O}$  wesentlich schnellere Dynamik der Struktur, was einer stärkeren Kopplung an Librationsbewegungen mit möglichen Beiträgen aus resonantem Energietransfer und der Delokalisierung der Schwingungsanregungen zugeschrieben wurde.

Simulationen der 2DIR-Photonenechos und Pump-Probe-Signale der O-H-Streckschwingung von flüssigem Wasser<sup>[238]</sup> wurden durch direkte numerische Integration der Schrödinger-Gleichung erhalten, wobei symmetrische und antisymmetrische Streckschwingungen, intermolekulare Kopplungen, Fluktuationen und Anharmonizitäten der Übergangsfrequenzen sowie Dipolmomente berücksichtigt wurden. Diese Art der Simulation lässt nichtadiabatische Übergänge zwischen Schwingungspotentialflächen auf jeder beliebigen Zeitskala zu.

Die Dielektrizitätskonstante wurde zur Skalierung der resonanten Dipol-Dipol-Kopplung verwendet und um das experimentell beobachtete Abklingen der anisotropen Polarisation (80 fs) zu reproduzieren. Die beste Übereinstimmung ( $12\text{ cm}^{-1}$ ) wurde für die Kopplung unmittelbar benachbarter Moleküle gefunden. Eine Lebensdauer von 200 fs wird angenommen. Abbildung 20 zeigt, dass die simulierten Signalformen, Amplituden und Dynamiken in guter Übereinstimmung mit dem Experiment sind. Die negativen und positiven Signale entsprechen den Fundamentalfrequenzen der Übergänge bzw. der Absorption im angeregten Zustand. Sowohl



**Abbildung 20.** 2DIR-Photonenechospektren ( $k_i = -k_1 + k_2 + k_3$ ) der O-H-Streckschwingung in  $\text{H}_2\text{O}$  für Besetzungszeiten von  $t_2 = 0, 50$  und  $200\text{ fs}$ . Oben: experimentelle Daten,<sup>[123]</sup> unten: Simulationen mit direkter numerischer Propagation. Jedes Spektrum ist auf den Maximalwert normalisiert. (Wiedergabe nach Lit. [238]).

im Experiment als auch in der Simulation ist das Signal der Fundamentalen entlang der Diagonalen gestreckt, was eine anfängliche Inhomogenität bei  $t_2 = 0\text{ fs}$  impliziert. Mit zunehmender Zeit  $t_2$  wird die Signalorientierung zunehmend vertikaler. Die abgeflachten Signale für die Fundamentalen und die Knotenlinien zwischen den beiden Signalen deuten auf schnelle Fluktuationen und den Verlust der Inhomogenität im roten Bereich des Spektrums hin. Die anfänglichen Korrelationen im roten Bereich des Spektrums klingen in 100 fs ab, bleiben aber im blauen Bereich bis über 200 fs hinaus erhalten.

Die große Zahl von Akzeptormoden, Anharmonizitäten und Fluktuationen im Wasser eröffnen vielfältige Pfade für den intermolekularen Energietransfer, was trotz der schwachen Kopplung ( $12\text{ cm}^{-1}$ ) zum vollständigen Verlust der Polarisationsanisotropie in den beobachteten Zeitskalen (80 fs) führt. Der resonante Energietransfer hat bei kleinen Werten von  $t_2$  ( $< 200\text{ fs}$ ) nur einen geringen Effekt im 2DIR-Photonenechospektrum. Die durch schnelle dynamische Prozesse verursachten Signale im 2DIR-Photonenechospektrum stammen hauptsächlich von Fluktuationen der lokalen O-H-Streckschwingungsfrequenz, deren anharmonisches Potential sehr empfindlich auf Veränderungen in der Wasserstoffbrückenumgebung reagiert. Die O-H-Streckschwingung ist eine ausgezeichnete Sonde für das Netzwerk von Wasserstoffbrücken in  $\text{H}_2\text{O}$ . 2DIR-Spektren anderer Flüssigkeiten wie Formamid sollten mit dem gleichen Protokoll simuliert werden können.<sup>[239–241]</sup>

Die Untersuchung der Dynamik von Wasser in räumlich begrenzten biologischen,<sup>[249,250]</sup> chemischen<sup>[251]</sup> und geologischen<sup>[252]</sup> Volumina findet erhebliches experimentelles und theoretisches Interesse.<sup>[231–233,242–248]</sup>

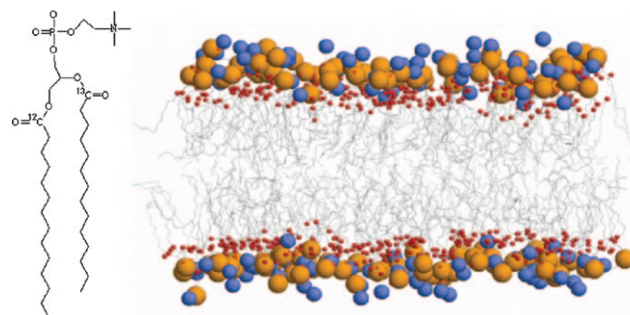
Mehrere 2DIR-Studien wurden an inversen Micellen, insbesondere an Aerosol OT (AOT) ausgeführt. Messungen der O-H-Schwingung von verdünntem HOD in einem Tropfen von  $\text{H}_2\text{O}$  oder  $\text{D}_2\text{O}$ <sup>[242–245]</sup> haben gezeigt, dass dynamische Prozesse in räumlich begrenzten Umgebungen langsamer als in der Volumenphase sind. Durch Messung der stimulierten Schwingungsechos und spektral aufgelösten Schwingungs-

echoverschiebungen konnten Fayer und Mitarbeiter nachweisen, dass der in begrenzten Umgebungen schnellste Prozess (die Fluktuation der Wasserstoffbrückenlänge; 50 fs) ähnlich schnell wie in flüssigem Wasser ist, wohingegen der langsame Prozess der globalen Strukturentwicklung ( $> 1$  ps) in räumlich stark begrenzten Systemen um bis zu eine Größenordnung langsamer werden kann.<sup>[244,245]</sup> Auch die Dynamik von reinem Wasser in inversen Micellen wurde untersucht.<sup>[231,233,246]</sup> IR-Pump-Probe- und Schwingungsecho-Spektroskopie sprechen für die Existenz zweier unabhängig relaxierender Subensembles in Wasser.<sup>[231,233]</sup> In der Tropfenmitte (Kern) ähnelt die Dynamik derjenigen in der freien Phase, in der Randzone (Schale) werden die Prozesse dagegen langsamer. Die Dicke der „Schale“ wurde zu 0.4 nm bestimmt.<sup>[231]</sup> Das dynamische Verhalten von Wasser in räumlich begrenzten Phospholipidmembranen wurde ebenfalls untersucht.<sup>[232,247,248]</sup> Anders als bei inversen Micellen, die durch die Wechselwirkung mit dem Wasser eine Kern-Schale-Struktur einnehmen, wird das dynamische Verhalten des Wassers in Membranen von starken Wasserstoffbrücken mit den polaren Gruppen der Phospholipidmembranen bestimmt.

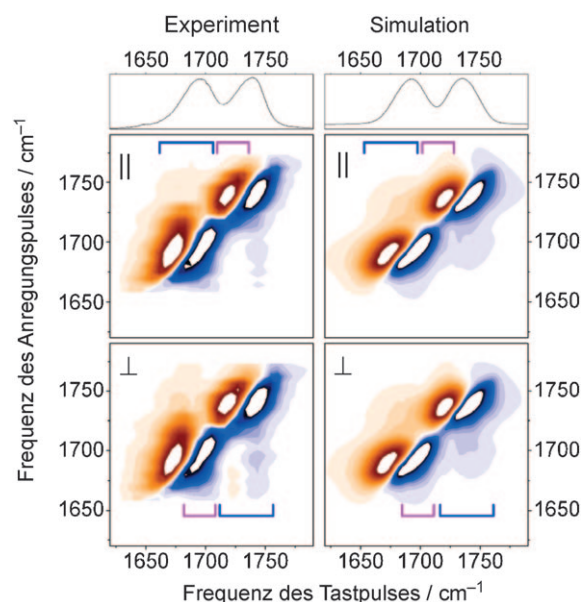
## 7. Anwendungen auf Phospholipide. Quasipartikel-darstellung von 2DIR-Signalen

Als wesentlicher Bestandteil der Zelle<sup>[253]</sup> stellt die Membran Informations- und Energiegradienten her und kontrolliert deren Fluss. Die allgemein bekannten Struktur-motive in der polaren Oberfläche von Zellmembranen (Carbonyl-, Phosphat- und Chlorgruppen) vermitteln molekulare Erkennungsvorgänge und Signalübertragungen.<sup>[253,254]</sup> Mit den verfügbaren Untersuchungstechniken ist es jedoch schwierig, detaillierte Kenntnisse über die Anordnung und Dynamik dieser Gruppierungen zu gewinnen. Zum Beispiel werden Neutronenbeugungsmuster durch laterale Unregelmäßigkeiten in den Lipiddoppelschichten verschmiert, und NMR-Resonanzen erscheinen aufgrund der eingeschränkten Bewegungsfreiheit verbreitert, ähnlich etwa wie in der Festkörper-NMR-Spektroskopie. Die IR-Spektroskopie der Carbonylgruppen in Phospholipidmembranen hat daher vermehrte Aufmerksamkeit gefunden.<sup>[255–259]</sup> Die Absorptionsbande zeigt einen deutlich inhomogenen Charakter und lässt sich als Überlagerung mehrerer Subzustände beschreiben.<sup>[255,256]</sup> Die Signalformen der Carbonyl-Schwingungen von Phospholipiden könnten direkte Informationen über die molekulare Architektur und Fluktuationen in der Membranschicht liefern.<sup>[260,261]</sup> Für die großen spektralen Inhomogenitätsunterschiede in der lokalen Umgebung der sn-1- und sn-2-Carbonylgruppen wurden viele mögliche Quellen ausgemacht, darunter die Art der Packung,<sup>[256,258]</sup> lokale Kettenkonformationen,<sup>[258,259,262–264]</sup> die relativen Positionen der beiden Carbonylgruppen bezüglich der Grenzfläche<sup>[132,259,265]</sup> und der Hydratisierungsgrad.<sup>[266,267]</sup> In einer eleganten Studie konnten Blume et al.<sup>[266]</sup> alle Szenarien, die auf lokalen Strukturunterschieden beruhen, ausräumen, mit Ausnahme der Wasserstoffbrückenbindungen. In einer anderen Studie<sup>[268]</sup> wurden unterschiedliche Hydratisierungen als mögliche Quelle von Inhomogenitäten ausgeschlossen.

Abbildung 21 zeigt eine Doppelschicht des Phospholipids Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC). Ein 2DIR-Spektrum der C=O-Streckschwingung dieser Doppelschicht ist in Abbildung 22 gezeigt.<sup>[107]</sup> Die Entartung der sn-1- und sn-2-Carbonylgruppen wurde durch  $^{13}\text{C}$ -Markierung der sn-2-Kette aufgehoben, sodass zwei breite Banden bei 1697 und 1740  $\text{cm}^{-1}$  beobachtet wurden.



**Abbildung 21.** Chemische Struktur des Phospholipids DMPC und eine Momentaufnahme der DMPC-Doppelschicht aus einer MD-Simulation (Wassermoleküle sind weggelassen). P orange, N blau, O rot.



**Abbildung 22.** Linke Spalte: Experimentelle Pump-Probe-Spektren der Carbonylgruppen in Fragmenten der Phospholipidmembran. Von oben: Absorptions- und Pump-Probe-Spektren bei paralleler und senkrechter Polarisierung der Anregungs- und Tastpulse. Rechte Spalte: Die entsprechenden simulierten Spektren. Blaue und violette Klammern deuten die Regionen der Interbanden- bzw. Intrabanden-Kreuzsignale an.<sup>[107]</sup>

Die in Abschnitt 3 beschriebene SOS-Methode erfordert die Diagonalisierung des Terms für zwei Excitonen in der Hamilton-Matrix. Die Skalierung der Zeit mit  $N^4$  bedingt bei großen  $N$ -Werten einen kaum zu bewältigenden Rechenaufwand. Mit dem Ansatz der Quasipartikelstreuung steht aber eine Methode zur Verfügung, die den Rechenbedarf deutlich reduziert. Bei der Quasipartikelstreuung setzt man einen Hamilton-Operator an, der die Zahl der Anregungen kon-

serviert, sowie ein Dipolmoment, das nur eine Anregung erzeugen oder annihilieren kann. Die optischen Übergänge werden als Quasipartikel („Excitonen“) betrachtet, und ihre Kollisionen verursachen die Nichtlinearität.

Der Hamilton-Operator der Amid-I-Bande [Gl. (3) in Abschnitt 3] kann durch Terme für die Bildung und Annihilation von Bosonen angenähert werden [Gl. (31)], wobei  $B^\dagger$  und  $B$  die Erzeugungs- bzw. Annihilations-Operatoren der Bosonen sind und die Bedingung  $[B_m^\dagger, B_n] = \delta_{nm}$  erfüllen.

$$\hat{H} = \sum_m \omega_m \hat{B}_m^\dagger \hat{B}_m + \sum_{m,n}^{m \neq n} J_{m,n} \hat{B}_m^\dagger \hat{B}_n - \frac{1}{2} \sum_m \Delta_m \hat{B}_m^\dagger \hat{B}_m^\dagger \hat{B}_m \hat{B}_m + \sum_{m,n}^{m \neq n} K_{mn} \hat{B}_m^\dagger \hat{B}_n^\dagger \hat{B}_m \hat{B}_n \quad (31)$$

Die ersten zwei Terme beschreiben die freien Excitonen, wobei  $\omega_m$  die lokale Amid-I-Frequenz ist und  $J_{mn}$  die Kopplung zwischen den Gruppen beschreibt, die die Excitonensprünge induziert.  $\Delta_m$  und  $K_{mn}$  stehen für die Anharmonizitäten innerhalb der Gruppen bzw. zwischen den Gruppen.

Das Quasipartikelbild entsteht zwanglos aus der Lösung der nichtlinearen Excitonengleichungen (NEEs, nonlinear exciton equations).<sup>[62,64]</sup> Eine Schlüsselkomponente ist die Green-Funktion,  $\mathcal{G}$ , die die zeitliche Entwicklung der beiden Excitonen beschreibt und die Bethe-Salpeter-Gleichung erfüllt [Gl. (32)].

$$\mathcal{G}(\Omega) = \mathcal{G}^{(0)}(\Omega) + \mathcal{G}^{(0)}(\Omega) \Gamma(\Omega) \mathcal{G}^{(0)}(\Omega) \quad (32)$$

$\mathcal{G}^{(0)}$  beschreibt die Dynamik der beiden nichtwechselwirkenden Excitonen.  $\Gamma$  ist die Zwei-Excitonen-Streumatrix. Ihr Matricelement  $\bar{\Gamma}_{e_4 e_3, e_2 e_1} \Omega$ <sup>[61]</sup> beschreibt einen Prozess, in dem zwei ankommende Excitonen  $e_1$  und  $e_2$  gestreut werden und die Excitonen  $e_3$  und  $e_4$  erzeugen.

Nominell skaliert der Rechenaufwand sowohl der Quasipartikel-Formulierung als auch der SOS über  $N^4$  mit der Systemgröße. In der Praxis wird aber eine viel vorteilhaftere Skalierung erreicht, dank der lokalisierten Beschaffenheit der Excitonen und ihrer Wechselwirkungen (Anharmonizitäten).<sup>[55]</sup> Zur Verdeutlichung betrachten wir den Überlappungsfaktor zweier Excitonen [Gl. (33)].

$$\eta_{ee'}^{(1)} = \sum_m |\psi_{e,m} \psi_{e',m}| \quad (33)$$

Dieser Parameter charakterisiert die Zwei-Excitonen-Konfiguration im realen Raum; für  $e = e'$  folgt  $\eta_{ee'}^{(1)} \equiv 1$ . Für nichtgekoppelte Schwingungen gilt  $J_{mn} = 0$  und  $\eta_{ee'}^{(1)} = \delta_{ee'}$ , was bedeutet, dass die Excitonen nicht wechselwirken. Da Excitonwechselwirkungen eine kurze Reichweite haben (die Anharmonizität ist lokal), kann die Wahrscheinlichkeit eines Streueignisses durch die Annahme genähert werden, dass Excitonene paare ( $e_1 e_2$ ) nur dann streuen können, wenn die

Überlappung einen bestimmten Grenzwert („cutoff“)  $\eta_c: \eta_{e_1 e_2}^{(1)} > \eta_c$  übersteigt. Das Kriterium lässt sich ebenso auf das abgehende Excitonene paar ( $e_3 e_4$ ) anwenden. Durch Verwendung dieses Grenzwertes, der jeweils den Abstand sowohl zwischen den beiden ursprünglichen als auch zwischen den beiden resultierenden Excitonen in der Streumatrix einer Randbedingung unterwirft, skaliert die Zahl der relevanten Streumatrixelemente mit  $N^2 N_c^2$  anstatt mit  $N^4$ , wobei  $N_c$  eine finite Korrelationslänge ist; die Streumatrix ist nun dünn besetzt.

Eine zweite hilfreiche Randbedingung ergibt sich aus dem Radius der Exciton-Exciton-Streuung, der bestimmt, wie weit sich zwei Excitonen während ihrer Wechselwirkung bewegen können und der Entfernung zwischen den ursprünglichen und resultierenden Excitonene paaren eine Obergrenze setzt. Wir führen diesen Grenzwert ein, indem wir einen zweiten Überlappungsparameter definieren [Gl. (34)].

$$\eta_{ee'}^{(2)} = \sum_{e_1, m, n} |\psi_{e_1, m} \psi_{e_1, n} \psi_{e, m} \psi_{e', n}| \quad (34)$$

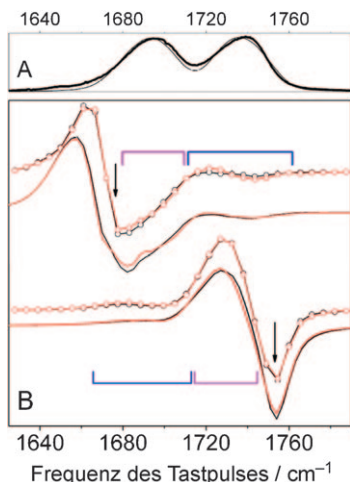
$\eta^{(2)}$  ist die Amplitude eines von  $e$  zu  $e'$  gehenden Pfades, der über alle möglichen Zwischenzustände  $e_1$  verläuft. Ein Grenzwert für  $\eta_{ee'}^{(2)}$  kann dazu dienen, die dominierenden  $e_3 e_2$ -Paare in der Streumatrix  $\Gamma_{e_4 e_3, e_2 e_1}$  auszuwählen.

Durch Verwendung beider Begrenzungskriterien  $\eta_c^{(1)}$  und  $\eta_c^{(2)}$  verbleiben nur die Streumatrixelemente, die folgende Bedingungen erfüllen:  $\eta_{e_2 e_1}^{(1)} > \eta_c^{(1)}$ ,  $\eta_{e_4 e_3}^{(1)} > \eta_c^{(1)}$ ,  $\eta_{e_3 e_2}^{(1)} > \eta_c^{(2)}$ ,  $\eta_{e_4 e_1}^{(1)} > \eta_c^{(2)}$  und  $\eta_{e_4 e_2}^{(1)} > \eta_c^{(2)}$ . Die Skalierung des Rechenaufwandes mit der Systemgröße reduziert sich dadurch auf  $N$ . Die Ersparnis, die umso höher wird, je größer das System ist, rührt von zwei Faktoren her: 1) Die relevanten Excitonenzustände können vor der Berechnung der Streumatrix identifiziert werden, und ihre Anzahl ist in der Regel viel kleiner als  $N^4$ . Die Streumatrix braucht daher nur für ausgewählte Streukonfigurationen berechnet zu werden. 2) Der erforderliche numerische Aufwand für die Signalberechnung wird dank der dünn besetzten Streumatrix deutlich reduziert.

In Abbildung 22 werden die experimentellen und simulierten Pump-Probe-Spektren von Carbonylgruppen in einer Phospholipiddoppelschicht für parallel und senkrecht polarisierte Pump- und Probe-Pulse verglichen. Die lokalen Amid-I-Frequenzen betragen  $1708 \text{ cm}^{-1}$  ( $^{13}\text{C}$ -markiert) und  $1755 \text{ cm}^{-1}$  (unmarkiert) nach Korrektur um den Stark-Effekt:  $\Delta\omega = k E_{\text{proj}}$ , wobei  $E_{\text{proj}}$  die Projektion des elektrischen Feldes entlang der C=O-Bindung ist. Nichtdiagonale Elemente wurden durch Anwendung des Übergangsdipolkopplungsmodells erhalten.<sup>[149]</sup> Im Experiment wurde ein schmaler Anregungspuls ( $16 \text{ cm}^{-1}$ ) und ein kurzer (100 fs), harter Tastpuls verwendet. Das Signalfeld ist spektral dispers. Die experimentellen Bandenbreiten, die aus der fluktuierenden elektrostatischen Umgebung resultieren, sowie auch ihre charakteristische Form (diagonal verlängerte, inhomogene Verbreiterung) werden durch die Simulationen gut reproduziert. Die beiden starken Diagonalresonanzen entsprechen den Absorptionen der beiden Carbonylgruppen.



Die Kreuzsignale in den 2D-Spektren sind wenig intensiv. Die zwei horizontalen Ausschnitte der experimentellen und simulierten Signale werden in Abbildung 23 verglichen. Sowohl die Intensitäten als auch die Signalförmigkeiten der Intra-



**Abbildung 23.** A) Experimentelle Absorption (dicke Linie) und berechnete lineare optische Absorption (dünne Linie) von DMPC in Wasser. B) Experimentelle (offene Kreise) und berechnete (durchgezogene Linien) Lochbrennspektren bei Anregung mit 1675 und 1752 cm<sup>-1</sup> (siehe Pfeile). Die Farben Schwarz (parallel) und Rot (senkrecht) geben die Polarisierungsbedingungen der Pulse an; die senkrechten Spektren sind um den Faktor 3 vergrößert. Blaue und violette Klammern deuten die Regionen der Interbanden- und Intrabanden-Kreuzsignale an (siehe auch Abbildung 22).

und Interbanden-Kreuzsignale werden recht gut modelliert. Jede Resonanz hat eine negative (blaue) Komponente aufgrund von GSB und ESE sowie eine positive (violette) Komponente aufgrund von ESA (siehe Abbildung 10). Die Rotverschiebung der ESA-Bande spiegelt die Anharmonizität der Carbonylschwingung wider. Die Kreuzsignale sind deutlicher ausgeprägt, wenn die Anregungs- und Tastpulse senkrecht zueinander polarisiert sind (Abbildung 22,  $\perp$ ). Abbildung 23 B zeigt horizontale Ausschnitte für den parallel ( $\parallel$ ) und senkrecht ( $\perp$ ) polarisierten Fall aus Abbildung 22 bei den Anregungsfrequenzen 1675 und 1752 cm<sup>-1</sup> (durch Pfeile angedeutet). Die Kreuzsignale sind ein direktes Maß für die Schwingungskopplung zwischen den Carbonylgruppen. Durch quantitativen Vergleich der experimentellen und simulierten Spektren können strukturelle Informationen wie die Verteilung der Winkel zwischen den intramolekularen Carbonylpaares erhalten werden. Die Anordnung dieser Paare wird über den Winkel zwischen den Übergangsdipolmomenten und ihren Abstand ausgedrückt. Die Schwingungsfrequenzen der beiden gekoppelten Carbonylgruppen,  $\omega_n$  und  $\omega_m$ , werden durch Diagonalisierung des Hamilton-Operators der Excitonen erhalten [Gl. (35)].

$$\mathbf{H}_{\text{red}} = \begin{pmatrix} \omega_n^0 & J_{mn} \\ J_{mn} & \omega_m^0 \end{pmatrix} \quad (35)$$

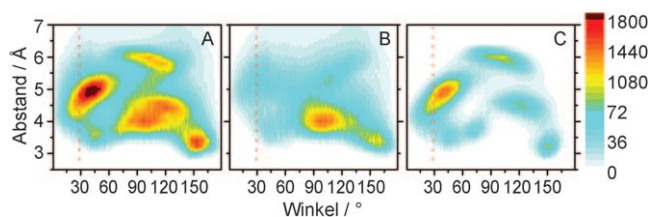
Das Ergebnis hängt vom Kopplungsparameter  $J_{mn}$  und der Differenz der Diagonalfrequenzen,  $\omega_n^0 - \omega_m^0$ , ab. Ferner defi-

nieren wir die Paarkopplungsparameter  $\beta'_{mn}$  [Gl. (36)] und die gewichtete Verteilungsfunktion der Radialwinkel [Gl. (37)], wobei sich die Summierungen in  $m$  und  $n$  auf die <sup>12</sup>CO- bzw. <sup>13</sup>CO-Carbonylgruppen beziehen.

$$\beta'_{mn} = |\omega_m - \omega_n| - |\omega_m^0 - \omega_n^0| \quad (36)$$

$$h(R, \theta) = \left\langle \sum_{m \in {}^{12}\text{CO}} \sum_{n \in {}^{13}\text{CO}} \beta'_{mn} \delta(R - R_{mn}) \delta(\theta - \theta_{mn}) \right\rangle \quad (37)$$

Abbildung 24 zeigt die berechneten Verteilungsfunktionen  $h(R, \theta)$  bei Berücksichtigung aller <sup>12</sup>CO, <sup>13</sup>CO-Paare (A), nur der intermolekularen Paare (B) und nur der intramolekularen Paare (C). In Tafel A verschwindet  $h(R, \theta)$  bei Ab-



**Abbildung 24.** Über  $\beta'$  gewichtete Verteilungsfunktionen der Radialwinkel [Gl. (37)] in der simulierten DMPC-Doppelschicht unter Berücksichtigung A) aller <sup>12</sup>CO, <sup>13</sup>CO-Paare, B) der intermolekularen <sup>12</sup>CO, <sup>13</sup>CO-Paare und C) der intramolekularen <sup>12</sup>CO, <sup>13</sup>CO-Paare. Die gepunkteten roten Linien markieren die aus der experimentellen Anisotropie der Spektren abgeleiteten Winkel. Der farbige Balken kennzeichnet die statische Verteilung gemäß Gleichung (37).

ständen  $> 6.5$  Å, was belegt, dass die Kreuzsignale von benachbarten Carbonylgruppen dominiert werden. Die Verteilungsfunktion  $h(R, \theta)$  in Abbildung 24 A besteht aus mehreren Strukturfamilien, deren inter- oder intramolekulare Herkunft leicht durch den Vergleich mit Abbildung 24 B und C ausgemacht werden kann. Die intermolekulare Verteilungsfunktion (Abbildung 24 B) zeigt keine Zufallsorientierungen, obwohl sie breiter als die intramolekulare Funktion ist. Das scharfe Signal bei  $\theta = 40^\circ$  und  $R = 5$  Å in Abbildung 24 C stimmt mit dem Winkel zwischen den aus der experimentellen Anisotropie erhaltenen Übergangsdipolmomenten überein, was auf seine vorwiegende Herkunft aus intramolekularen Paaren hindeutet. Wir halten aber fest, dass bei diesem Winkel auch intermolekulare Carbonyl-Paare signifikant zum Signal beitragen (bis zu  $26 \pm 5\%$  der gesamten  $h(R, \theta)$ -Funktion, siehe Abbildung 24).

Diese Simulationen belegen die wichtige Rolle von elektrostatischen Wechselwirkungen an der polaren Grenzfläche. Sowohl die Kopplungen der Übergangsdipolmomente als auch die Fluktuationen des elektrischen Feldes beeinflussen die Bandenformen der Absorptionsbanden. Die beiden Beiträge, die gefaltet und im linearen Antwortsignal ununterscheidbar sind, sind in den diagonalen und nichtdiagonalen Bereichen der 2D-Korrelationsdiagramme deutlich separiert. Die Intensitäten der Kreuzsignale sind ein direktes Maß für den Beitrag der Kopplungen zur Form des Gesamtsignals. Die



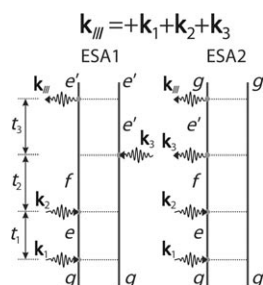
diagonale Elongation entsteht durch die Frequenzdispersion der Excitonenzustände und die lokalen Fluktuationen des elektrischen Feldes. Die Bandenformen im 2D-Spektrum bieten so einzigartige Einblicke in die Beschaffenheit der Schwingungsanregungen.

Die kombinierte Verwendung von 2DIR-Spektroskopie und Quasipartikelsimulationen bietet eine vielversprechende Methode zur Untersuchung von Phospholipiddoppelschichten, Lipid-Protein-Komplexen, niederdimensionalen Lipidsystemen und Polymeren.

## 8. Doppelquantenkohärenzspektroskopie

In der NMR-Spektroskopie werden gewöhnlich maßgeschneiderte Pulssequenzen eingesetzt, um den bestmöglichen Informationsgewinn zu erzielen. Vergleichbare Strategien können auch zur Entwicklung von 2DIR-Verfahren genutzt werden, indem man die Quantenpfade, die den mehrdimensionalen Signalen zugrunde liegen, manipuliert. Hier zeigen wir, wie ein Signal so modifiziert werden kann, dass es für nichtwechselwirkende Excitonen verschwindet und damit als eine hervorragende Sonde für solche Wechselwirkungen dient.

Die bisher diskutierten Anwendungen verwendeten vor allem die  $\mathbf{k}_I$ - und  $\mathbf{k}_{II}$ -Signale. Das  $\mathbf{k}_{III}$ -Signal ( $=\mathbf{k}_1+\mathbf{k}_2-\mathbf{k}_3$ ) enthält andere Arten von Information. Es ist durch die beiden Quantenpfade ESA1 und ESA2 gegeben (Abbildung 25),



**Abbildung 25.** Darstellung der zum Signal beitragenden Pfade im Liouville-Raum in einem doppelseitigen Feynman-Diagramm unter Verwendung der Näherung der rotierenden Welle. Das Diagramm für die Absorption im ersten angeregten Zustand (ESA1) entspricht  $R_7$ , das für die Absorption im zweiten angeregten Zustand (ESA2)  $R'_4$ .

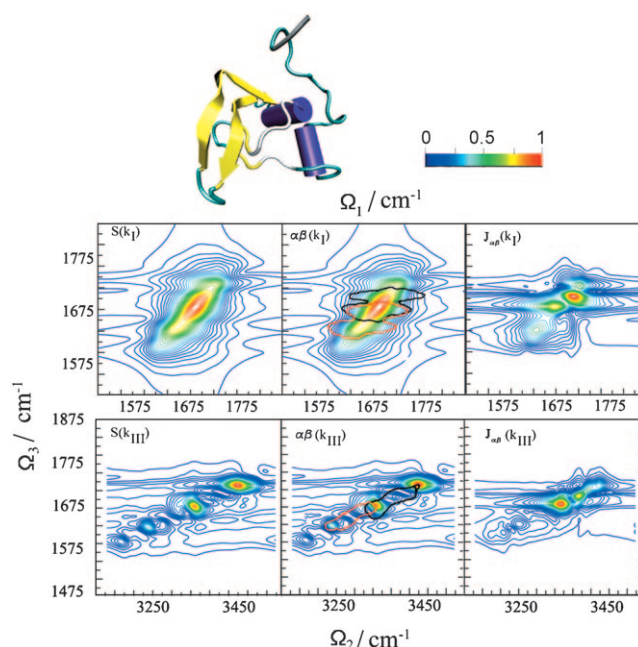
analog zur Doppelquantenkohärenztechnik in der NMR-Spektroskopie.<sup>[269]</sup> In beiden Diagrammen befindet sich das System innerhalb von  $t_2$  in einer kohärenten Superposition des doppelt angeregten Zustands  $f$  mit dem Grundzustand  $g$ . Dieses Zeitintervall erlaubt also eine ungestörte Betrachtung von Zwei-Excitonen-Zuständen. Am günstigsten betrachtet man  $(\Omega_2, \Omega_3)$ -Signale, die durch Variieren der Zeitintervalle  $t_2$  und  $t_3$  zugänglich sind.  $(\Omega_1, \Omega_2)$ -Signale sind auch möglich.

Beim Durchfahren von  $\Omega_2$  zeigt das Signal Resonanzen der verschiedenen doppelt angeregten Zustände  $f$ . Die Projektion entlang der anderen Achse,  $\Omega_3$ , unterscheidet sich in beiden Diagrammen. In ESA2 befindet sich das System während  $t_3$  in einer Kohärenz von  $e'$  mit  $g$ . Beim Durchfahren von  $\Omega_3$  werden bei  $\Omega_3 = \omega_{e'g}$  die Einzelexcitonenresonanzen

sichtbar. In ESA1 befindet sich das System in einer Kohärenz von  $e'$  mit  $f$  während  $t_3$ . Die Kohärenz verursacht zahlreiche neue Resonanzen bei  $\Omega_3 = \omega_{fe}$ , die allen möglichen Übergängen zwischen doppelt und einfach angeregten Zuständen entsprechen. Bemerkenswert ist dabei, dass für nichtwechselwirkende Excitonen der Zustand  $f$  einfach als das direkte Produkt des Zustands  $e$  und  $e'$  gegeben ist und die Doppelanregungsenergie die Summe der Einzelanregungsenergien ist, sodass sich die beiden Diagramme exakt löschen. Das Resonanzmuster dieser 2D-Korrelationsauftragungen liefert damit einen charakteristischen Fingerabdruck der beteiligten Excitonen.

Die erhöhte Auflösung der  $\mathbf{k}_{III}$ -Signale ist der Abwesenheit der Diagonalsignale zu verdanken, die die  $\mathbf{k}_I$ -Spektren dominieren und die nichtdiagonalen Kreuzsignale überdecken, sowie der verdoppelten Frequenzbandbreite der Doppelquantenkohärenzen.

Am Beispiel der Proteindomäne TB6 zeigen wir, dass  $(\Omega_2, \Omega_3)$ -Auftragungen von  $\mathbf{k}_{III}$  empfindlicher für die Kopplungen zwischen Schwingungsmoden sind als  $(\Omega_2, \Omega_3)$ -Auftragungen von  $\mathbf{k}_I$  (Abbildung 26).<sup>[270]</sup> Wir haben eine Emp-



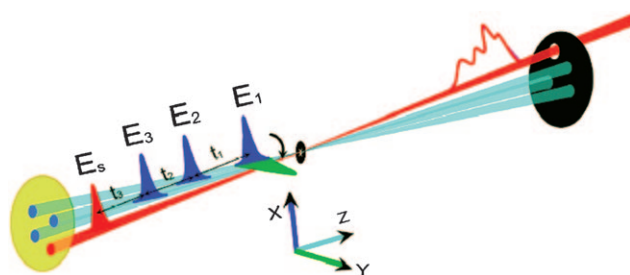
**Abbildung 26.** Obere Reihe: Simuliertes Signal und Empfindlichkeitsanalyse für das  $\mathbf{k}_I$ -Signal der TB6-Proteindomäne.  $S_{k_I}$  ist das Signal,  $\alpha\beta(k_I)$  gibt die zur  $\alpha$ -Helix (rote Kontur) und zum  $\beta$ -Faltblatt (schwarze Kontur) gehörenden Regionen wieder.  $J_{\alpha\beta}(k_I)$  gibt die zur Kopplung zwischen der  $\alpha$ -Helix und dem  $\beta$ -Faltblatt gehörende Region wieder. Untere Reihe: gleiche Größen für das  $\mathbf{k}_{III}$ -Signal.

findlichkeitsanalyse genutzt, um die verschiedenen Regionen der komplexen Spektren globulärer Proteine bestimmten Sekundärstrukturen zuzuordnen und die überlagernden Bereiche zu separieren. Wir führen eine kleine Verschiebung  $\eta_v$  der Energien  $\varepsilon_m^v$  der zum  $v$ -ten Sekundärstrukturmotiv gehörenden Moden ein ( $\eta_v$  sollte deutlich kleiner sein als alle  $J_{mn}$ ). Die Differenz von gestörtem und ungestörtem Spektrum bezieht die Empfindlichkeit des Spektrums hinsichtlich der

Störung, und die spektrale Region lässt sich dann der Struktur des Typs  $\nu$  zuordnen. Abbildung 26 zeigt die simulierten  $\mathbf{k}_T$ - ( $S_{\mathbf{k}_T}$ ) und  $\mathbf{k}_{III}$ -Signale ( $S_{\mathbf{k}_{III}}$ ) sowie die Zerlegung in die Signale der Helix- und der Haarnadelsegmente.

### 9. Chiralitätseffekte: Verbesserung der spektralen Auflösung

Die Puls polarisation bietet eine ganze Reihe einfacher Kontrollparameter für die Manipulation von 2DIR-Signalen. Dazu definieren wir ein kohärentes heterodynes Signal dritter Ordnung  $\nu_3\nu_2\nu_1$ , wobei die drei einfallenden Pulse entlang der  $\nu_1$ -,  $\nu_2$ - und  $\nu_3$ -Richtungen und der Signalpuls entlang  $\nu_4$  polarisiert ist (Abbildung 27).



**Abbildung 27.** Pulsconfiguration für die kohärente Femtosekunden-Infrarotkorrelationsspektroskopie. Drei Laserpulse (hellblau) wechselwirken mit der Probe, der vierte (rot) tastet die nichtlineare Antwort ab. Die Parameter zur Kontrolle des Experiments sind die Zeitabstände  $t_1$ ,  $t_2$  und  $t_3$  der Pulse. Alle Pulse propagieren in z-Richtung. Das „nichtchirale“ Signal xxxx wird erzeugt, wenn alle Pulse entlang x polarisiert sind (blau und rot). Das chiraliätsinduzierte Signal xxyy wird durch Änderung der Polarisationsrichtung des ersten Pulses nach y erhalten (grün).

Moleküle sind typischerweise kleiner als die optische Wellenlänge, und ihr Antwortsignal lässt sich dann adäquat mit der Annahme beschreiben, dass das Feld über das Molekül hinweg homogen ist (auch als Dipol- oder langwellige Näherung bezeichnet). Unsere Analyse hat sich bisher auf diesen Fall beschränkt. Ferner haben wir angenommen, dass alle Pulse parallel polarisiert sind, sodass wir die Puls polarisation nicht spezifizieren mussten. Das nichtlineare Antwortsignal hängt allgemein von dem über alle Orientierungen gemittelten Produkt von vier Dipolen ab,  $\langle \mu_{\mu}^{\nu_3} \mu_{\mu}^{\nu_2} \mu_{\mu}^{\nu_1} \mu_{\mu}^{\nu_4} \rangle$ . In isotropen Proben gibt nur drei unabhängige Polarisationskonfigurationen: xxyy, xyxy und xyyx. Alle anderen Konfigurationen können durch deren Linearkombinationen ausgedrückt werden.

Die Phasenmodulation des optischen Feldes entlang eines Moleküls kann zu weiteren Signalbeiträgen führen, die von Interferenzen zwischen den in unterschiedlichen Abschnitten des Moleküls erzeugten Signalen verursacht werden und die typischerweise 1000-mal schwächer sind als die (vom Dipol erzeugten) Hauptbeiträge (dies entspricht dem Verhältnis zwischen der Chromophorlänge und der optischen Wellenlänge). Indem man Polarisationskonfigurationen selektiert, für die der Dipol-Term verschwindet (z.B. xxyy), lassen sich die Interferenzsignale hintergrundfrei erhalten und leicht

detektieren. Werden diese Signale gespiegelt, ändern sie ihr Vorzeichen, sodass sie bei Racematen und achiralen Molekülen verschwinden und damit nur bei chiralen Systemen auftreten.

Der Circular dichroismus (CD), d.h. die Differenz in der Absorption von links- und rechts-zirkular polarisiertem Licht,<sup>[271–273]</sup> ist das einfachste chirale Signal. Diese lineare 1D-Technik wird routinemäßig zur Untersuchung der Faltungszustände und Konformationen von Proteinen eingesetzt. CD-Spektren haben positive und negative Komponenten, und die Beiträge unterschiedlicher Chromophore interferieren (dagegen sind Absorptionsspektren positiv und additiv und enthalten keine Interferenzen). Dies macht die Methode besonders empfindlich für die Unterscheidung von Proteinsekundärstrukturen. In ganz ähnlicher Weise kann auch die Empfindlichkeit von 2D-Experimenten durch eine geschickte Wahl der Polarisationskonfigurationen verbessert werden. Chiralitätsinduzierte (CI) 2D-Methoden können als nichtlineare Varianten der CD-Spektroskopie gelten.<sup>[274,275]</sup> Chiralität lässt sich auch anhand der Raman-optischen Aktivität (ROA) messen.<sup>[276]</sup> Die ROA-Technik quantifiziert die Differenz der Raman-Intensitäten, die durch rechts- und links-zirkular polarisiertes Licht induziert werden. Die Signalformen der Schwingungs-CD(VCD)-Spektroskopie sind charakteristisch für die Sekundärstrukturen von Polypeptiden. Protonierte  $\alpha$ -helicale Strukturen ergeben bimodale Signale für die Amid-I- und Amid-A-Bande,<sup>[277,278]</sup> dagegen nur ein Signal für die Amid-II-Bande.<sup>[279]</sup> Im deuterierten Fall zeigt die Amid-I-Bande drei Maxima, charakteristisch für rechtsgängige Helices.<sup>[279]</sup>  $\alpha$ -Helices und antiparallele  $\beta$ -Faltblätter sind anhand der Frequenzverschiebung der Amid-I-Bande unterscheidbar, und die Signalform wechselt von der bimodalen Form mit kleiner Aufspaltung zwischen den Maxima zu zwei separierten negativen Signalen.<sup>[280]</sup> Die Amid-I-Bande von Zufallsknäueln ist ebenfalls bimodal, aber mit umgekehrten Vorzeichen wie bei der  $\alpha$ -Helix.<sup>[280,281]</sup> Verglichen mit der  $\alpha$ -Helix liegt die Amid-II-Bande der  $3_{10}$ -Helix bei höherer VCD-Frequenz und niedrigerer IR-Frequenz. Die Ursache könnten Unterschiede im Wasserstoffbrückenmuster sein (4  $\rightarrow$  1 und 5  $\rightarrow$  1).<sup>[282]</sup>

Die Antwortfunktion einer chiraliätsinduzierten  $\mathbf{k}_T$ -Technik hängt vom gemittelten Produkt (38) ab,<sup>[64]</sup> wobei  $\mathbf{j}_e^{\nu}(\mathbf{k})$  der Übergangsdipol des Excitons im  $\mathbf{k}$ -Raum ist [Gl. (39)].

$$\langle \mathbf{j}_{e_4}^{\nu_4}(-\mathbf{k}_1 + \mathbf{k}_2 + \mathbf{k}_3) \mathbf{j}_{e_3}^{\nu_3}(\mathbf{k}_3) \mathbf{j}_{e_2}^{\nu_2}(\mathbf{k}_2) \mathbf{j}_{e_1}^{\nu_1}(\mathbf{k}_1) \rangle \quad (38)$$

$$\mathbf{j}_e^{\nu}(\mathbf{k}) = \sum_m e^{i\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}_m} \mu_m^{\nu} \psi_{e,m} \quad (39)$$

Molekulare Chiralität kann in Form von dreidimensionalen Verteilungen der lokalen Übergänge im Realraum ausgedrückt werden. Der Einfachheit halber vernachlässigen wir die lokale Chiralität der einzelnen Peptideinheiten (die aus ihrem magnetischen Dipol und elektrischen Quadrupol resultiert) und betrachten nur die globale (strukturelle) Chiralität. Chiralitätsbedingte Signale hängen explizit von den

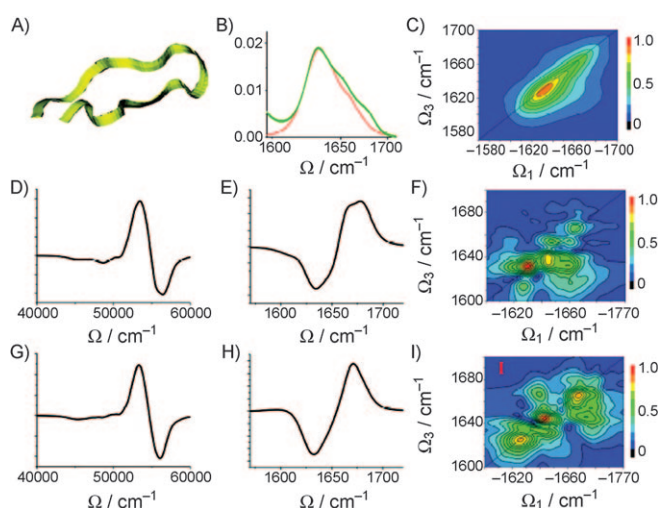
Positionen der verschiedenen lokalen Übergänge ab. Für den impulsfreien Excitonenzustand definieren wir den Vektor des Übergangsdipols wie in Gleichung (40) und den Beitrag erster Ordnung in  $\mathbf{k}$  wie in Gleichung (41).

$$\mathbf{j}_e^\nu \equiv \mathbf{j}_e^\nu(\mathbf{k} = 0) = \sum_m \boldsymbol{\mu}_m^\nu \psi_{e,m} \quad (40)$$

$$\bar{\mathbf{j}}_e^{K,\nu} = \sum_m \mathbf{r}_m^K \boldsymbol{\mu}_m^\nu \psi_{e,m} \quad (41)$$

Hierbei ist  $\mathbf{r}_m$  die Koordinate des  $m$ -ten Übergangs,  $\boldsymbol{\mu}_m$  ist der Übergangsdipol und  $\psi_{e,m}$  die Wellenfunktion des Excitons. Die Gleichung (40) ist unabhängig von  $\mathbf{r}_m$  und hat keinen Chiralitätsbezug. Die Gleichung (41) geht über die Dipol-Näherung hinaus. Für Komponenten wie  $xxxx$  mit einer geraden Zahl wiederholender Indizes ist der erste Term endlich und dominiert das Signal, das demzufolge nicht chiralitätssensitiv ist. Bei Komponenten mit ungerader Zahl wiederholender Indizes, z.B.  $xxxy$ , verschwindet der erste Ausdruck, und das Signal wird nun von chiralitätssensitiven Termen bestimmt. Die chiralitätsinduzierten Signale ergeben sich aus Produkten der Form  $\langle \mathbf{r}_{mn}^{v_5} \boldsymbol{\mu}_m^{v_4} \boldsymbol{\mu}_n^{v_3} \boldsymbol{\mu}_k^{v_2} \boldsymbol{\mu}_l^{v_1} \rangle$ . „Nichtchirale“ Techniken hängen nur implizit von der Struktur ab, also über den Einfluss der Struktur auf die Frequenzen und Übergangsdipole, die wiederum die Signalpositionen und Intensitäten bestimmen. Die explizite Koordinatenabhängigkeit der chiralen Antwortsignale führt zu einer Verstärkung der Kreuzsignale, was der Grund dafür ist, warum diese Techniken empfindlicher für strukturelle Details sind.

In isotropen Proben gibt es drei unabhängige chiralitätsinduzierte Polarisationskonfigurationen für kollineare Pulse und sechs weitere nicht-kollineare Terme.<sup>[61]</sup> Weiterhin hängen die Signale von der Größe und Richtung der Wellenvektoren ab. Abbildung 28 zeigt Simulationen der chiralen Antwort der Amid-I-Schwingungen, wenn alle Strahlen entlang  $z$  propagieren. Die zum Vergleich gezeigten elektronischen CD-Spektren wurden mit dem Standard-Excitonmodell von Woody simuliert, das die elektrischen und magnetischen Momente der Chromophore berücksichtigt,<sup>[271]</sup> und somit von der lokalen und globalen Chiralität abhängt. Unsere Simulationen zeigen am Beispiel des Trpzip4-Peptids (Abbildung 28A),<sup>[283]</sup> dass CI-Techniken komplementär zur CD- und NMR-Spektroskopie sind. Seine robuste Struktur macht Trpzip4 zu einem ausgezeichneten Modell für die Charakterisierung der Schwingungszustände von Peptidkonformationen in wässriger Lösung.<sup>[283]</sup> Die Amid-I-Bande (Abbildung 28B) besteht aus drei überlappenden Komponenten. Das Signal bei  $1635\text{ cm}^{-1}$  und die Schulter bei  $1675\text{ cm}^{-1}$  werden der b-Struktur zugeordnet,<sup>[283]</sup> während die Schulter bei  $1655\text{ cm}^{-1}$  von Turn- und Coil-Strukturen an den Enden der Peptidkette stammt. Die diagonalen 2D-xxxx-Signale (Abbildung 28C) geben die Absorption wieder. NMR-Spektren werden routinemäßig genutzt, um Randbedingungen für die Analyse von Peptidstrukturen festzulegen; hierzu werden die Abstandsgeometrien optimiert, wodurch ein Satz



**Abbildung 28.** Anwendung chiralitätsinduzierter 2D-Korrelationsspektroskopie zur Unterscheidung von NMR-spektroskopisch ununterscheidbaren Haarnadelstrukturen. A) Haarnadelpeptid Trpzip4 mit 15 Aminosäuren. B) Simulierte (rot) und experimentelle Absorption<sup>[17]</sup> (grün) der Amid-I-Bande. C) Simulierte xxx-2D-Signale der Amid-I-Bande. Mittlere und untere Reihe: Vergleich von simulierten Spektren für zwei Konfigurationen aus Ensembles von NMR-spektroskopisch bestimmten Haarnadelstrukturen. D, G) Elektronische CD-Spektren der Amidbande; E, H) VCD-Spektren der Amid-I-Bande und F, I) xxx-Cl-2D-Signale der Amid-I-Bande. Die CD-Signale der zwei gezeigten Konfigurationen sind ähnlich. Größere Differenzen in den 2D-Kreuzsignalen weisen auf spezifische Kopplungen der Schwingungsmoden hin.

von Konfigurationen resultiert, der mit den NMR-Daten konform ist.<sup>[8]</sup> Wir beschränken unsere Analyse auf die ersten zwei von 20 NMR-spektroskopisch bestimmten Trpzip4-Strukturen, die die niedrigsten Energien haben und daher die besten Strukturvorschläge darstellen. Der RMSD zwischen den Strukturen beträgt  $1.517\text{ Å}$ . Die berechneten elektronischen (Abbildung 28D und G) und Schwingungs-CD-Spektren (Abbildung 28E und H) der Konformere sind ähnlich, wogegen sich die 2D-CI-Spektren (Abbildung 28F und I) deutlich unterscheiden. Das Konformer I hat intensive Kreuzsignale bei  $1635\text{ cm}^{-1}$  und  $1655\text{ cm}^{-1}$ , während die Kreuzsignale von II bei  $1655\text{ cm}^{-1}$  und  $1675\text{ cm}^{-1}$  liegen.

Diese Beispiele demonstrieren, wie mithilfe chiralitätsinduzierter 2D-Signale die Kreuzkorrelationen zwischen verschiedenen Teilen eines Proteins verstärkt werden können, was bei der Zuordnung der Signale zu strukturellen Eigenschaften sehr hilft. Die Kreuzsignale reagieren sehr empfindlich auf Änderungen der Sekundärstruktur, und aus ihren Vorzeichen kann auf die Konfiguration der einzelnen Chromophore geschlossen werden (positive und negative Kreuzsignale entsprechen unterschiedlichen Drehrichtungen der beteiligten Übergangsdipole). Die Kombination von kohärenten 2D-Techniken mit dem räumlichen Ansprechvermögen chiralitätsinduzierter Polarisationskonfigurationen ergibt ein leistungsfähiges Werkzeug zur Verfolgung von frühen Proteinfaltungseignissen mit der Möglichkeit, gemittelte Proteinstrukturen und ihre Fluktuationen entlang des Faltungspfades mit Femtosekundauflösung zu bestimmen.



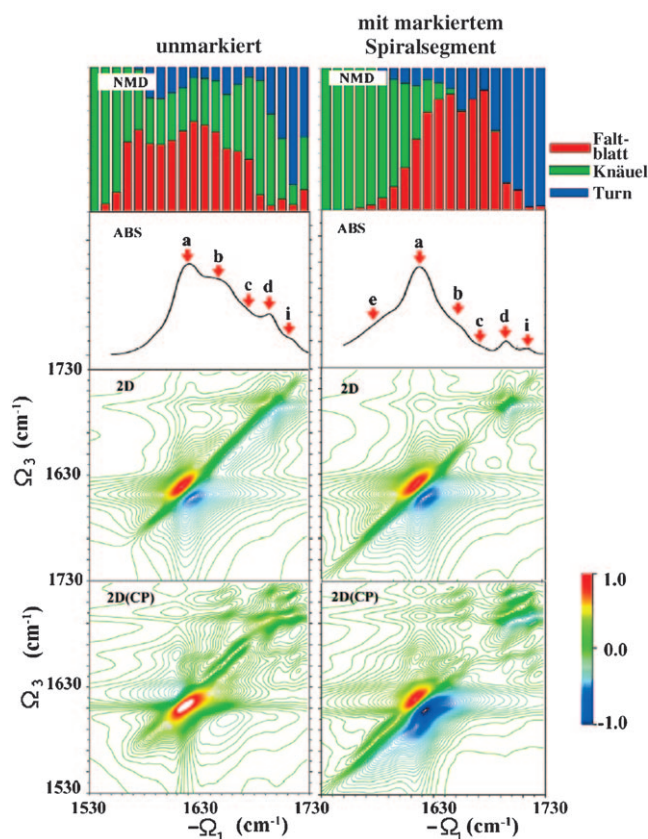
Chiralitätsinduzierte 2D-Signale sind schwächer als ihre „nichtchiralen“ Gegenstücke und konnten bisher experimentell noch nicht beobachtet werden. Da es sich um hintergrundfreie Signale handelt, sollte aber die Möglichkeit bestehen, solche Signale mit modernsten IR-Techniken zugänglich zu machen. Die hier beschriebene Konfiguration mit kollinearem Puls ist am einfachsten zu realisieren. Die bei vielen Techniken vorhandene Selektivität bezüglich des Wellenvektors geht in diesem Fall verloren, kann aber mithilfe von Phasenschleifentechniken wiederhergestellt werden.<sup>[23–25, 48–55, 63, 269, 284]</sup> Durch sorgfältig abgestimmte nicht-kollineare Pulssequenzen kann es gelingen, die „nichtchiralen“ Terme zu löschen, sodass nur die CI-Terme übrig bleiben. Die Pulsconfiguration kann zur Untersuchung spezifischer Tensorkomponenten maßgeschneidert werden. Beispielsweise kann das kollineare *xxxy*-Signal in nicht-kollinearer Geometrie gemessen werden, wenn alle Laserstrahlen in einer (*yz*)-Ebene angeordnet sind, der erste, *y*-polarisierte Strahl entlang *z* propagiert und die anderen, *x*-polarisierten Strahlen Wellenvektorkomponenten in *y* haben. Für diese Konfiguration verschwinden alle „nichtchiralen“ Beiträge, und nur die *xxxy*-Komponente bleibt übrig.

## 10. Die Struktur von Amyloidfibrillen

Die Bildung von Amyloidablagerungen,<sup>[285]</sup> deren Hauptkomponente ein aus 39 bis 43 Aminosäuren aufgebautes A $\beta$ -Peptid ist,<sup>[286]</sup> wurde als wesentliche Ursache der Alzheimer-Krankheit (AD) identifiziert.<sup>[287]</sup> Trotz ihrer identischen Aminosäuresequenz in den Resten 1–39 haben die A $\beta$ -Peptide deutlich verschiedene biochemische Eigenschaften. So bildet das Derivat A $\beta$ 42 (mit 42 Resten) wesentlich stabilere Fibrillen und lagert sich schneller ab als die anderen Amyloide.<sup>[288]</sup> Ferner ist A $\beta$ 42 hydrophober als die kürzeren Varianten, was durch zwei zusätzliche, hydrophobere Aminosäurereste am Ende des Peptidstrangs verursacht wird.<sup>[289]</sup> Besonders wichtig ist, dass A $\beta$ 42 eine drastisch höhere Resistenz gegen Proteaseabbau zeigt.<sup>[289]</sup>

Die strukturellen Ursachen dieser Unterschiede sind nicht vollständig geklärt. Wegen der nichtkristallinen, unlöslichen und mesoskopisch-heterogenen Beschaffenheit der Fibrillen wird vor allem die NMR-Spektroskopie als Methode zur Strukturuntersuchung genutzt,<sup>[285, 290]</sup> während z.B. die Röntgenkristallographie eher ungeeignet ist. Die NMR-Daten geben strukturelle Randbedingungen vor, die in Kombination mit Geometrieoptimierungen und MD-Simulationen plausible Strukturmodelle liefern. Das allgemein akzeptierte Strukturmodell für A $\beta$ 42 stammt aus Arbeiten von Riek et al. und wird als M42 bezeichnet.<sup>[290]</sup> M42 kann in drei Molekülbereiche zergliedert werden: 1) die Reste 1–16, die ein Zufallsknäuel bilden, 2) die Reste 26–31, die den Turn bilden, und 3) die übrigen Reste 32–42, die zwei  $\beta$ -Stränge bilden. Die meisten NMR-Analysen beziehen sich auf den Bereich der  $\beta$ -Stränge. Für die Turn-Region fehlen experimentelle Randbedingungen, sodass die Geometrieoptimierung in hohem Maße vom Rechenprotokoll und dem empirischen Kraftfeld abhängt. 2DIR-Spektren wurden kürzlich veröffentlicht.<sup>[109, 110]</sup>

Die simulierte Absorption von M42 (Abbildung 29 links, Tafel ABS) zeigt ein intensives Signal bei 1635 cm<sup>-1</sup> (a), eine Schulter bei 1655 cm<sup>-1</sup> (b), eine Absorption bei 1675 cm<sup>-1</sup> (c) und zwei weitere Signale bei 1695 cm<sup>-1</sup> (d) und 1715 cm<sup>-1</sup> (i).



**Abbildung 29.** Linke Spalte von oben nach unten: Normalmodendia-gramm (NMD), Absorptionssignal (ABS), *xxxy*-polarisiertes 2D-Kreuzspektrum (2D) und das durch kontrollierte kohärente Polarisation optimierte 2D-Kreuzspektrum (2D(CP)) des unmarkierten Amyloids M42. Im NMD sind der  $\beta$ -Strang, das Spiralsegment und das Turn-Segment in Rot, Grün bzw. Blau dargestellt. Rechts: gleiche Darstellungen für M42 mit isotoopenmarkiertem Spiralsegment.

Die Tafel NMD in der linken Spalte von Abbildung 29 zeigt die Zerlegung der Normalschwingungen in die drei Struktur motive ( $\beta$ -Faltblatt-, Turn- und Spiralsegment („Coil“)). Die Signale a, b und c enthalten starke Beiträge der  $\beta$ -Strang- und Spiralsegmente. Das Signal d enthält Beiträge der Turn- und Spiralsegmente, und das Signal i wird ausschließlich durch das Turn-Segment verursacht. Die Tafel 2D in der linken Spalte von Abbildung 29 zeigt das simulierte *xxxy*-2DCS-Signal, das von starken und breiten Diagonalanteilen dominiert wird, während keine Kreuzsignale auftreten. Die Beiträge der drei Struktur motive überlappen. Verglichen mit typischen NMR-Spektren erschweren die geringere Auflösung und die Delokalisierung der Normalschwingungen die Interpretation der Kreuzsignale. Durch Isotoopenmarkierung in Kombination mit einer geschickten Auswahl der Polarisationskonfiguration lassen sich gewünschte Spektralbereiche der 2DCS-Spektren jedoch gezielt verbessern. So führt die

$^{13}\text{C}^{18}\text{O}$ -Markierung eines Peptidrests zu einer Rotverschiebung der Amid-I-Bande um  $65\text{ cm}^{-1}$ , wodurch das betreffende Signal deutlich von den unmarkierten Banden separiert wird und nun analysiert werden kann.

2D-Signale werden durch Interferenzen vieler Einzelbeiträge (Pfade im Liouville-Raum) verursacht. Es besteht die Möglichkeit, diese Interferenzen über die relativen Polarisationen der einzelnen Strahlungspulse zu kontrollieren, um so die diagonalen Beiträge zu löschen und die Kreuzsignale zu verstärken. Im Folgenden zeigen wir, wie ein Algorithmus zur kohärenten Kontrolle genutzt werden kann, um die 2DIR-Spektren von A $\beta$ 42 zu manipulieren und gut aufgelöste Kreuzsignale zu erhalten, die die Wechselwirkungen innerhalb des Turn-Segments sowie zwischen dem Turn-Segment und den  $\beta$ -Faltblättern direkt wiedergeben.

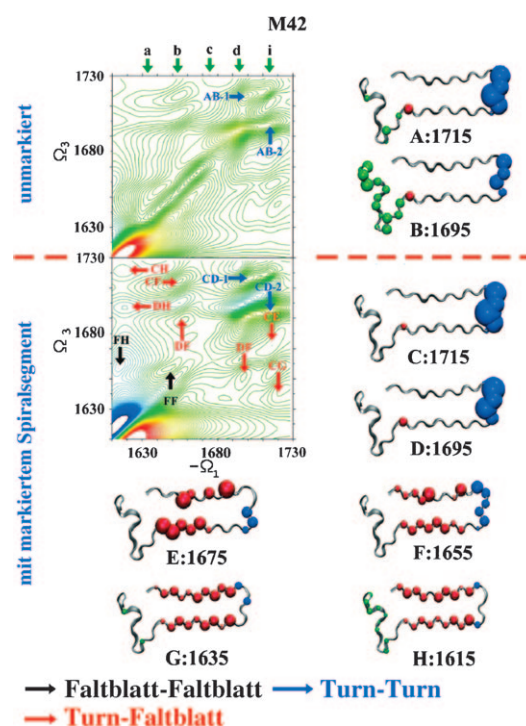
Wir haben die Überlagerung der drei unabhängigen Tensorkomponenten  $T_j = xxyy; xyxy; yyyx$  optimiert, um das Diagonalsignal bei  $1655\text{ cm}^{-1}$  zu unterdrücken [Gl. (42)].

$$W(\omega_1, \omega_3) = \sum_j c_j T_j \quad (42)$$

Die Koeffizienten  $c_j$  wurden mit einem genetischen Algorithmus optimiert,<sup>[291]</sup> um so die Kontrollgröße, d.h. das Verhältnis der bezüglich der Intensität integrierten Diagonallinie des 2D-Spektrums zum integrierten Diagonalsignal bei  $1655\text{ cm}^{-1}$  (mit  $\delta = 10\text{ cm}^{-1}$ ), zu minimieren. Für zehn Mitglieder einer Population wurde eine schnelle exponentielle Konvergenz innerhalb von 100–200 Generationen erreicht. Im Vergleich zum nicht-kontrollierten  $xxxx$ -Signal (Abbildung 29 links, Tafel 2D) hat das Kreuzsignal (Abbildung 29 links, Tafel 2D(CP)) einen höheren Informationsgehalt.

Das CP-Signal von M42 zeigt starke Kreuzsignale für Korrelationen zwischen den Absorptionen d und i. Die Signale sind in Abbildung 30 vergrößert dargestellt und als AB-1 (1695, 1715) und AB-2 (1715, 1695) gekennzeichnet. Die zu den Diagonalkomponenten beitragenden Normalschwingungen wurden auf die lokalen Amidbanden entlang des Rückgrats projiziert, um die Kreuzsignale innerhalb der Struktur lokalisieren zu können. Die i-Moden (Abbildung 30, A:1715) sind im Turn-Segment lokalisiert, wobei der größte Anteil auf Rest 28 entfällt. Die d-Moden (Abbildung 30, B:1695) sind nahezu gleichverteilt im Spiralsegment und den Resten 28–30 des Turns lokalisiert. In Anbetracht der großen Distanz zwischen Spiralsegment und Turn (siehe Abbildung 30) erwarten wir, dass die Wechselwirkung vernachlässigbar ist und ordnen diese beiden Kreuzsignale stattdessen Wechselwirkungen innerhalb des Turns, insbesondere unter den Resten 28–30 zu.

Die meisten Signale in den M42-Spektren enthalten Beiträge von mehr als einem Strukturmotiv, was ihre eindeutige Zuordnung erschwert. Nimmt man dagegen eine Isotopenmarkierung des Spiralsegments vor (Reste 1–16), so erhält man Signale, die von einzelnen Strukturmotiven dominiert werden (Abbildung 29, rechte Spalte). Die neue Schulter e im linearen Absorptionsspektrum (Abbildung 29, rechts, Tafel ABS) geht vor allem auf das Spiralsegment zurück. Die Komponenten a, b und c werden durch die Faltblattstruktur



**Abbildung 30.** Oberhalb der gestrichelten Linie: 2DCS-Signal von M42 mit der unter kohärenter Kontrolle optimierten Polarisationsfunktion (Abbildung 29, untere linke Tafel, 2D(CP)) auf einer gespreizten Skala ( $1630\text{--}1730\text{ cm}^{-1}$ ) und Projektion der zu spezifischen Kreuzsignalen beitragenden Normalschwingungen auf die lokalen Amidmoden entlang des Aminosäurerückgrats. Unterhalb der gestrichelten Linie: gleiche Darstellung für M42 mit isotonenmarkiertem Spiralsegment. In der 2DCS-Auftragung sind die Kreuzsignale aufgrund von Wechselwirkungen innerhalb des Turn-Segments (blaue Pfeile), zwischen Turn und Faltblatt (rot) und innerhalb des Faltblatts (schwarz) unterschiedlich dargestellt. In den Projektionen der Normalmoden sind die Beiträge des Turn-Segments (blau), des Faltblatts (rot) und des Spiralsegments (grün) gezeigt. Grüne Pfeile über dem 2DCS-Diagramm geben die Positionen der Absorptionsmaxima an.

dominiert, während d und i vom Turn-Segment stammen. Das 2D-Spektrum der markierten Probe (Abbildung 29, rechte Spalte, Tafel 2D) weist eine verbesserte Auflösung der Kreuzsignale auf, das Hauptsignal ist aber nach wie vor unaufgelöst. Unser Protokoll zur kohärenten Kontrolle könnte eingesetzt werden, um die Diagonalkomponenten des isotonenmarkierten Peptids bei  $1655\text{ cm}^{-1}$  zu unterdrücken (Abbildung 29, rechte Spalte, Tafel 2D(CP)), wodurch die meisten Kreuzsignale dann klar zuzuordnen wären.

Die Signale C:1715 und D:1695 in Abbildung 30 belegen, dass die Kreuzsignale CD1 (1695,1715) und CD2 (1715,1695) der im Spiralsegment markierten Probe auf Wechselwirkungen innerhalb der Turns beruhen. Ferner zeigen die Signale H:1615 und G:1635 in Abbildung 30, dass die Frequenzen bei  $1615\text{ cm}^{-1}$  und  $1635\text{ cm}^{-1}$  vom Strangmotiv bestimmt werden. Die CH-, DH- und CG-Kreuzsignale lassen sich daher auf Wechselwirkungen zwischen dem Turn und den nahegelegenen Faltblattmotiven zurückführen (vor allem die Reste 24–25 und 32–33). Auch die Normalschwingungen bei  $1675\text{ cm}^{-1}$  (Abbildung 30, E:1675) werden vom Faltblattmotiv be-

stimmt, wobei die Population der lokalen Moden uneinheitlich ist und die Mode 25 keinerlei Beitrag liefert. Demzufolge stammt das CE-Signal vorrangig aus der Wechselwirkung zwischen dem Turn und Rest 32. Dagegen weisen die Normalschwingungen bei  $1655\text{ cm}^{-1}$  (Abbildung 30, F:1655) signifikante Beiträge sowohl des Faltblattmotivs als auch des Turns auf, sodass die CF-, DF1- und DF2-Signale vermischte Informationen über Wechselwirkungen innerhalb des Turns sowie zwischen Faltblatt und Turn enthalten. Die mit schwarzen Pfeilen markierten Kreuzsignale FF und FH stammen von Wechselwirkungen innerhalb der Faltblattstruktur.

## 11. Zusammenfassung und Ausblick

Das hier vorgestellte Arsenal an Rechenmethoden kann zur Beschreibung einer Vielzahl von Nichtgleichgewichtsprozessen verwendet werden, sofern diese langsamer als die typische Zeitskala eines 2D-Experiments sind ( $\approx 200\text{ fs}$ ). Unter dieser Voraussetzung dürfen wir annehmen, dass das System während der Messung stationär ist, aber dennoch durch zeitabhängige Parameter beeinflusst wird, die mit dem zu untersuchenden Prozess verbunden sind (z.B. Proteinfaltung, Konformationsänderungen, Bruch von H-Brücken). 2D-Spektren könnten dann quasi stroboskopische Aufnahmen derartiger Prozesse liefern. Die stochastischen Liouville-Gleichungen unterliegen nicht dieser Einschränkung und können die Dynamik eines Systems auf einer beliebigen Zeitskala beschreiben (d.h. schnellere oder langsamere Prozesse als die Messung).

Es ist nützlich, einige grundlegende Parallelen zwischen der 2D-Spektroskopie und dem rasch voranschreitenden Feld der Einzelmolekülspektroskopie aufzuzeigen.<sup>[292]</sup> Innerhalb eines durch die Pulsfolge festgelegten Zeitabschnitts unterliegt jedes Molekül einer stochastischen Entwicklung, und seine Eigenschaften (Frequenzen, Orientierungen und Dipolmomente) fluktuieren aufgrund von Kopplungen mit den unkontrollierbaren Freiheitsgraden des Umgebungsbads. Messungen makroskopischer Proben liefern den Mittelwert der stochastischen Trajektorien des Ensembles. Eine Einzelmolekülspektroskopie zerlegt dieses Ensemble „mit roher Gewalt“, und man beobachtet die individuellen Trajektorien eines Moleküls an einem einzelnen Zeitpunkt, was wesentlich detailliertere Informationen liefert als makroskopische Messungen. Die nichtlineare Spektroskopie strebt ein ähnliches Ziel an, nun aber durch Betrachtung des gesamten Ensembles zu verschiedenen Zeitpunkten. Es sind viele mikroskopische Modelle mit sehr unterschiedlichen Arten von Trajektorien denkbar, die denselben Ensemblemittelwert zu einem gegebenen Zeitpunkt liefern könnten. Die Mehrpunktkorrelationsfunktionen der nichtlinearen Spektroskopie sind in der Lage, zwischen solchen Modellen zu unterscheiden, obgleich keine individuellen Trajektorien beobachtet werden. Betrachten wir z.B. ein chemisch reaktives  $A \rightleftharpoons B$ -System im Gleichgewicht. Wenn die Reaktion auf der spektroskopischen Zeitskala langsam ist, ergibt sich das Absorptionsspektrum einfach aus dem gewichteten Mittel der Spezies A und B. 1D-Messungen werden in diesem Fall keine Informationen über

die Kinetik des Systems liefern. In einem 2D-Experiment kann hingegen das Zeitintervall  $t_2$  auf der kinetischen Zeitskala variiert werden, worauf sich die Kinetik der Reaktion aus der zeitlichen Entwicklung der Kreuzsignale ableiten lässt. Die Kreuzsignale bilden die Wahrscheinlichkeit ab, das System während  $t_1$  im Zustand A und während  $t_3$  im Zustand B vorzufinden. Typischerweise sind  $t_1$  und  $t_3$  viel kürzer als  $t_2$ , sodass es sich um eine durch  $t_2$  separierte Zwei-Punkt-Messung handelt. Dies ist komplementär zu Triggerexperimenten, bei denen das System aus dem Gleichgewicht gebracht und die anschließende Relaxation beobachtet wird.<sup>[92,293]</sup> Die Einzelmolekülspektroskopie verläuft auf langsamen Zeitskalen (Mikrosekunden und länger), wogegen die 2DIR-Spektroskopie Trajektorien im Femtosekundenbereich abtastet. Ein gemeinsames Problem beider Methoden ist, dass die Analyse auf *Ensembles von Trajektorien*, nicht aber auf *Konfigurationen* zurückgreift.<sup>[294]</sup>

Im letzten Jahrzehnt hat sich die 2DIR-Spektroskopie als eine nützliche Methode für die Strukturanalytik und die Untersuchung ultraschneller Prozesse etabliert. Die Technik hat eine geringere Strukturauflösung als die NMR-Spektroskopie, bietet dafür aber eine einzigartige Zeitauflösung. Dies und das gänzlich andere Beobachtungsfenster machen die 2DIR-Spektroskopie zu einer wertvollen, zur NMR-Spektroskopie komplementären Methode.

Frühe Studien auf diesem Gebiet zielten darauf ab, das Funktionsprinzip der Methode zu beweisen und Anwendungsperspektiven aufzuzeigen. Heute gilt das Interesse vor allem der Identifizierung spezifischer Systeme, bei deren Analyse die 2DIR-Spektroskopie besonders hilfreich sein kann. Die Entwicklung der notwendigen Protokolle zur quantitativen Analyse der 2DIR-Signale ist eine große Herausforderung. Konzertierte experimentelle und theoretische Studien sind nötig, um Referenzsysteme zu definieren, die man zur Verbesserung der gegenwärtigen Protokolle braucht. Wir erwarten einen ähnlichen Verlauf der Forschungen wie bei der Entwicklung der klassischen Kraftfelder für die Molekülmechanik.

Ein Softwarepaket (SPECTRON) zur Simulation von 2D-Signalen befindet sich derzeit in der Entwicklung.<sup>[55]</sup> Wir streben damit an, eine breite Palette an linearen und nicht-linearen optischen Signalen komplexer Biomoleküle zu berechnen. SPECTRON enthält Module zur Konstruktion der Hamilton-Operatoren für 1) die Amidbanden I, II, III und A und die elektronischen  $n-\pi^*$ - und  $\pi-\pi^*$ -Banden von Peptiden (basierend auf Simulationen der MD-Trajektorien), 2) die C=O-Streckschwingung in Guanin, die In-plane- oder Out-of-plane-, symmetrische oder asymmetrische NH- oder NH<sub>2</sub>-Biegeschwingung in Adenin, die Ring-C=N-Streckschwingung in Cytosin, 3) die O-H-Streckschwingung von Wasser und 4) die C-O-Streckschwingung von Membranlipiden. Der Code wurde kürzlich verwendet, um verschiedene Amid-Diagramme aufzustellen.<sup>[295]</sup> Die Schnittstelle zwischen SPECTRON und Standard-MD-Simulationspaketen wie CHARMM,<sup>[58]</sup> NAMD<sup>[296]</sup> und GROMOS<sup>[59]</sup> ist so gestaltet, dass die Trajektorien der MD-Simulationen direkt in binären Formaten oder ASCII gelesen werden können. Der Code kann auch 2D-Elektronenspektren von Aggregaten simulieren. Diese Anwendung wurde kürzlich in einem Übersichts-



artikel<sup>[64]</sup> vorgestellt und wird in diesem Aufsatz nicht behandelt.

*Diese Arbeit wurde durch die National Institutes of Health (GM59230) und die National Science Foundation (CHE-0745891) gefördert. W.Z. dankt der UCI für ein Promotionsstipendium. Wir danken Dr. Darius Abramavicius für viele hilfreiche Diskussionen sowie Dr. Cyril Falvo und Dr. Lijun Yang für nützliche Kommentare.*

Eingegangen am 5. Juni 2008,

veränderte Fassung am 17. September 2008

Übersetzt von Dr. Detlef Schröder, Prag

- [1] L. Stryer, *Biochemistry*, 2. Aufl., Freeman, New York, **1995**.
- [2] G. Rhodes, *Crystallography Made Crystal Clear: A Guide for Users of Macromolecular Models*, 3. Aufl., Academic Press, Burlington, **2006**.
- [3] D. J. Segel, A. Bachmann, J. Hofrichter, K. O. Hodgson, S. Doniach, T. Kiefhaber, *J. Mol. Biol.* **1999**, 288, 489.
- [4] S. Arai, M. Hirai, *Biophys. J.* **1999**, 76, 2192–2197.
- [5] L. Pollack, M. W. Tate, N. C. Darnton, J. B. Knight, S. M. Gruner, W. A. Eaton, R. H. Austin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 10115–10117.
- [6] T. Uzawa, T. Kimura, K. Ishimori, I. Morishima, T. Matsui, M. Ikeda-Saito, S. Takahashi, S. Akiyama, T. Fujisawa, *J. Mol. Biol.* **2006**, 357, 997–1008.
- [7] M. Pfuhl, P. C. Driscoll, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. A* **2000**, 358, 513–545.
- [8] K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley, New York, **1995**.
- [9] B. Gruenewald, C. U. Nicola, A. Lustig, G. Schwarz, H. Klump, *Biophys. Chem.* **1979**, 9, 137–147.
- [10] R. R. Ernst, G. Bodenhausen, A. Wokaun, *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*, Clarendon, Oxford, **1987**.
- [11] C. Rose-Petruck, R. Jimenez, T. Guo, A. Cavalleri, C. W. Siders, F. Raksi, J. A. Squier, B. C. Walker, K. R. Wilson, C. P. J. Barty, *Nature* **1999**, 398, 310–312.
- [12] M. Chergui, A. H. Zewail, *ChemPhysChem* **2009**, 10, 28–43.
- [13] A. H. Zewail, *Physical Biology, From Atoms to Medicine*, Imperial College Press, London, **2008**.
- [14] W. A. Eaton, V. Munoz, S. J. Hagen, G. S. Jas, L. J. Lapidus, E. R. Henry, J. Hofrichter, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2000**, 29, 327–359.
- [15] *Applications of Vibrational Spectroscopy in Life, Pharmaceutical and Natural Sciences* (Hrsg.: J. M. Chalmers, P. R. Griffiths), Wiley, New York, **2002**.
- [16] M. Hein, A. A. Wegener, M. Engelhard, F. Siebert, *Biophys. J.* **2003**, 84, 1208–1217.
- [17] R. Brudler, R. Rammelsberg, T. T. Woo, E. D. Getzor, K. Gerwert, *Nat. Struct. Biol.* **2001**, 8, 265–270.
- [18] M. Aki, T. Ogura, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, T. Kitagawa, *J. Phys. Chem. B* **2000**, 104, 10765–10774.
- [19] S. A. Asher, A. Ianoul, G. Mix, M. N. Boyden, A. Karnoup, M. Diem, R. Schweitzer-Stenner, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 11775–11781.
- [20] E. W. Blanch, L. A. Morozova-Roche, D. A. E. Cochran, A. J. Doig, L. Hecht, L. D. Barron, *J. Mol. Biol.* **2000**, 301, 553–563.
- [21] M. H. Cho, *Chem. Rev.* **2008**, 108, 1331–1418.
- [22] J. Bredenbeck, J. Helbing, C. Kolano, P. Hamm, *ChemPhysChem* **2007**, 8, 1747–1756.
- [23] C. Scheurer, S. Mukamel, *J. Chem. Phys.* **2001**, 115, 4989.
- [24] C. Scheurer, S. Mukamel, *J. Chem. Phys.* **2002**, 116, 6803–6816.
- [25] C. Scheurer, S. Mukamel, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2002**, 75, 989–999.
- [26] K. W. Kwak, S. Park, M. D. Fayer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 14221–14226.
- [27] R. Venkatramani, S. Mukamel, *J. Chem. Phys.* **2002**, 117, 11089–11101.
- [28] *Chem. Phys.* **2007**, 341(1–3) (Sonderband „Ultrafast Dynamics of Molecules in the Condensed Phase“).
- [29] W. Zhao, J. C. Wright, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 10994–10998.
- [30] E. I. Shakhnovich, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, 7, 29–40.
- [31] M. Karplus, J. A. McCammon, *Nat. Struct. Biol.* **2002**, 9, 646–652.
- [32] J. A. McCammon, S. C. Harvey, *Dynamics of Proteins and Nucleic Acids*, Cambridge University Press, Cambridge, **1987**.
- [33] X. Daura, K. Gademann, H. Schäfer, B. Jaun, D. Seebach, W. F. van Gunsteren, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 2393–2404.
- [34] J. N. Onuchic, Z. Luthey-Schulten, P. G. Wolynes, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1997**, 48, 545–600.
- [35] J. D. Bryngelson, J. N. Onuchic, N. D. Socci, P. G. Wolynes, *Protein Struct. Funct. Genet.* **1995**, 21, 167–195.
- [36] P. G. Wolynes, J. N. Onuchic, D. Thirumalai, *Science* **1995**, 267, 1619–1620.
- [37] S. Gnanakaran, H. Nymeyer, J. Portman, K. Y. Sanbonmatsu, A. E. Garcia, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, 13, 168–174.
- [38] Y. Duan, P. Kollman, *Science* **1998**, 282, 740.
- [39] J. Wang, J. Onuchic, P. Wolynes, *Phys. Rev. Lett.* **1996**, 76, 4861–4864.
- [40] C. D. Snow, B. Zagrovic, V. S. Pande, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 14548–14549.
- [41] P. L. Freddolino, F. Liu, M. Gruebele, K. Schulten, *Biophys. J.* **2008**, 94, L75–L77.
- [42] Y. Zhu, D. O. V. Alonso, K. Maki, C. Y. Huang, S. J. Lahr, V. Daggett, H. Roder, W. F. DeGrado, F. Gai, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 15486–15491.
- [43] J. Kubelka, W. A. Eaton, J. Hofrichter, *J. Mol. Biol.* **2003**, 329, 625–630.
- [44] C. D. Snow, N. Nguyen, V. S. Pande, M. Gruebele, *Nature* **2002**, 420, 102–106.
- [45] D. Frenkel, B. Smit, *Understanding Molecular Simulation: From Algorithms to Applications*, Academic Press, San Diego, **2002**.
- [46] D. Mohanty, R. Elber, D. Thirumalai, D. Beglov, B. Roux, *J. Mol. Biol.* **1997**, 272, 423–442.
- [47] C. Dellago, P. Bolhuis, F. Csajka, D. Chandler, *J. Chem. Phys.* **1998**, 108, 1964–1977.
- [48] V. Chernyak, W. M. Zhang, S. Mukamel, *J. Chem. Phys.* **1998**, 109, 9587–9601.
- [49] S. Mukamel, A. Piryatinski, V. Chernyak, *J. Chem. Phys.* **1999**, 110, 1711–1725.
- [50] A. Piryatinski, S. Tretiak, V. Chernyak, S. Mukamel, *J. Raman Spectrosc.* **2000**, 31, 125–135.
- [51] A. Piryatinski, V. Chernyak, S. Mukamel in *Ultrafast Infrared and Raman Spectroscopy* (Hrsg.: M. Fayer), Marcel Dekker, New York, **2001**, S. 349–382.
- [52] A. Piryatinski, V. Chernyak, S. Mukamel, *Chem. Phys.* **2001**, 266, 311–322.
- [53] C. Scheurer, A. Piryatinski, S. Mukamel, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 3114–3124.
- [54] A. Piryatinski, S. A. Asher, S. Mukamel, *J. Phys. Chem. A* **2002**, 106, 3524–3530.
- [55] W. Zhuang, D. Abramavicius, T. Hayashi, S. Mukamel, *J. Phys. Chem. B* **2006**, 108, 18034–18045.
- [56] J. P. Wang, J. X. Chen, R. M. Hochstrasser, *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110, 7545–7555.

- [57] N. Demirdoven, C. M. Cheatum, H. S. Chung, M. Khalil, J. Knoester, A. Tokmakoff, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7981–7990.
- [58] B. R. Brooks, R. E. Bruccoleri, B. D. Olafson, D. J. States, S. Swaminathan, M. Karplus, *J. Comput. Chem.* **1983**, *4*, 187–217.
- [59] W. R. P. Scott, P. H. Hünenberger, I. G. Tironi, A. E. Mark, S. R. Billeter, J. Fennen, A. E. Torda, T. Huber, P. Krüger, W. F. van Gunsteren, *J. Phys. Chem. A* **1999**, *103*, 3596–3607.
- [60] D. A. Pearlman, D. A. Case, J. W. Caldwell, W. S. Ross, T. E. Cheatham, S. Debolt, D. Ferguson, G. Seibel, P. Kollman, *Comput. Phys. Commun.* **1995**, *91*, 1–41.
- [61] D. Abramavicius, S. Mukamel, *J. Chem. Phys.* **2005**, *122*, 134305.
- [62] S. Mukamel, D. Abramavicius, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 2073–2098.
- [63] S. Mukamel in *Molecular Nonlinear Optics* (Hrsg.: J. Zyss), Academic Press, New York, **1994**, S. 1–46.
- [64] D. Abramavicius, B. Palmieri, V. Voronine, F. Šanda, S. Mukamel, *Chem. Rev.* **2008**, im Druck.
- [65] S. Mukamel, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2000**, *51*, 691–729.
- [66] S. Mukamel, *Principles of Nonlinear Optical Spectroscopy*, Oxford University Press, New York, **1995**.
- [67] S. M. George, A. L. Harris, M. Berg, C. B. Harris, *J. Chem. Phys.* **1984**, *80*, 83–94.
- [68] L. Allen, J. H. Elberly, *Optical Resonances and Two-Level Atoms*, Wiley, New York, **1975**.
- [69] A. Laubereau, W. Kaiser, *Rev. Mod. Phys.* **1978**, *50*, 607–665.
- [70] R. F. Loring, S. Mukamel, *J. Chem. Phys.* **1985**, *83*, 2116–2128.
- [71] L. J. Muller, D. Vandebout, M. Berg, *J. Chem. Phys.* **1993**, *99*, 810–819.
- [72] D. Vandebout, L. J. Muller, M. Berg, *Phys. Rev. Lett.* **1991**, *67*, 3700–3703.
- [73] M. Muller, K. Wynne, J. D. W. Vanvoorst, *Chem. Phys.* **1988**, *125*, 225–230.
- [74] S. Mukamel, *Phys. Rev. A* **1983**, *28*, 3480–3492.
- [75] S. Mukamel, R. F. Loring, *J. Opt. Soc. Am. B* **1986**, *3*, 595–606.
- [76] L. E. Fried, S. Mukamel, *Adv. Chem. Phys.* **1993**, *84*, 435.
- [77] Y. Tanimura, S. Mukamel, *J. Chem. Phys.* **1993**, *99*, 9496–9511.
- [78] L. J. Kaufman, J. Heo, L. D. Ziegler, G. R. Fleming, *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *88*, 207402.
- [79] K. Kubarych, C. J. Milne, R. J. D. Miller, *Chem. Phys. Lett.* **2003**, *369*, 635–642.
- [80] S. Saito, I. Ohmine, *J. Chem. Phys.* **1998**, *108*, 240–251.
- [81] A. Ma, R. M. Stratt, *J. Chem. Phys.* **2002**, *116*, 4972–4984.
- [82] K. Okumura, A. Tokmakoff, Y. Tanimura, *J. Chem. Phys.* **1999**, *111*, 492.
- [83] S. Mukamel, A. Piryatinski, V. Chernyak, *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 145–154.
- [84] *Ultrafast Phenomena XIII* (Hrsg.: R. D. Miller, M. M. Muri-name, N. F. Scherer, A. M. Weiner), Springer, Heidelberg, **2002**.
- [85] T. L. C. Jansen, K. Duppen, J. G. Snijders, *Phys. Rev. B* **2003**, *67*, 134206.
- [86] S. Saito, I. Ohmine, *J. Chem. Phys.* **2003**, *119*, 9073–9087.
- [87] C. J. Milne, Y. Li, R. J. D. Miller in *Time-Resolved Spectroscopy in Complex Liquids* (Hrsg.: R. Torre), Springer, New York, **2007**, S. 1.
- [88] S. Palese, J. T. Buontempo, L. Schilling, W. T. Lotshaw, Y. Tanimura, S. Mukamel, R. J. D. Miller, *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 12466–12470.
- [89] Y. L. Li, L. Huang, R. J. D. Miller, T. Hasegawa, Y. Tanimura, *J. Chem. Phys.* **2008**, *128*, 234507.
- [90] W. M. Zhang, V. Chernyak, S. Mukamel, *J. Chem. Phys.* **1999**, *110*, 5011.
- [91] M. C. Asplund, M. T. Zanni, R. M. Hochstrasser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 8219–8224.
- [92] C. Kolano, J. Helbing, M. Kozinski, W. Sander, P. Hamm, *Nature* **2006**, *444*, 469–472.
- [93] P. Mukherjee, I. Kass, I. Arkin, M. T. Zanni, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 3528–3533.
- [94] T. Brixner, J. Stenger, H. M. Vaswani, M. Cho, R. E. Blankenship, G. R. Fleming, *Nature* **2005**, *434*, 625–628.
- [95] J. D. Hybl, Y. Christophe, D. M. Jonas, *Chem. Phys.* **2001**, *266*, 295–309.
- [96] X. Q. Li, T. H. Zhang, C. N. Borca, S. T. Cundiff, *Phys. Rev. Lett.* **2006**, *96*, 57406.
- [97] T. H. Zhang, I. Kuznetsova, T. Meier, X. C. Li, R. P. Mirin, P. Thomas, S. T. Cundiff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 14227–14232.
- [98] P. Hamm, M. H. Lim, R. M. Hochstrasser, *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 6123–6138.
- [99] P. Hamm, M. Lim, W. F. DeGrado, R. M. Hochstrasser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 2036–2041.
- [100] S. Woutersen, P. Hamm, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 11316–11320.
- [101] M. T. Zanni, M. C. Asplund, R. M. Hochstrasser, *J. Chem. Phys.* **2001**, *114*, 4579–4590.
- [102] C. Fang, J. Wang, Y. S. Kim, A. K. Charnley, W. Barber-Armstrong, A. B. Smith, S. M. Decatur, R. M. Hochstrasser, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 10415–10427.
- [103] H. Maekawa, C. Toniolo, A. Moretto, Q. B. Broxterman, N. H. Ge, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 5834–5837.
- [104] A. T. Krummel, P. Mukherjee, M. T. Zanni, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 9165–9169.
- [105] O. F. A. Larsen, P. Bodis, W. J. Buma, J. S. Hannam, D. A. Leigh, S. Woutersen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 13378–13382.
- [106] Z. Ganim, H. S. Chung, A. W. Smith, L. P. Deflores, K. C. Jones, A. Tokmakoff, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 432–441.
- [107] V. Volkov, R. Chelli, W. Zhuang, F. Nuti, Y. Takaoka, A. M. Papini, S. Mukamel, R. Righini, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 15323–15327.
- [108] J. Bredenbeck, A. Ghosh, M. Smits, M. Bonn, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2152–2153.
- [109] S. H. Shim, D. B. Strasfeld, Y. L. Ling, M. T. Zanni, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 14197–14202.
- [110] C. Paul, J. P. Wang, W. C. Wimley, R. M. Hochstrasser, P. H. Axelsen, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5843–5850.
- [111] Y. S. Kim, L. Liu, P. H. Axelsen, R. M. Hochstrasser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 7720–7725.
- [112] J. Bredenbeck, J. Helbing, R. Behrendt, C. Renner, L. Moroder, J. Wachtveitl, P. Hamm, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 8654–8660.
- [113] H. S. Chung, Z. Ganim, K. C. Jones, A. Tokmakoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 14237–14242.
- [114] J. Bredenbeck, J. Helbing, J. R. Kumita, G. A. Woolley, P. Hamm, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 2379–2384.
- [115] M. Broquier, C. Crepin, H. Dubost, J. P. Galaup, *Chem. Phys.* **2007**, *341*, 207–217.
- [116] J. N. Bandaria, S. Dutta, S. E. Hill, A. Kohen, C. M. Cheatum, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 22–23.
- [117] J. F. Cahoon, K. R. Sawyer, J. P. Schlegel, C. B. Harris, *Science* **2008**, *319*, 1820–1823.
- [118] J. C. Deak, S. T. Rhea, L. K. Iwaki, D. D. Dlott, *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104*, 4866–4875.
- [119] D. D. Dlott, *Chem. Phys.* **2001**, *266*, 149–166.
- [120] C. J. Fecko, J. D. Eaves, J. J. Loparo, A. Tokmakoff, P. L. Geissler, *Science* **2003**, *301*, 1698–1702.
- [121] J. D. Eaves, J. J. Loparo, C. J. Fecko, S. T. Roberts, A. Tokmakoff, P. L. Geissler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 13019–13022.
- [122] J. B. Asbury, T. Steinell, C. Stromberg, S. A. Corcelli, C. P. Lawrence, J. L. Skinner, M. D. Fayer, *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 1107–1119.

- [123] D. Kraemer, M. L. Cowan, A. Paarmann, N. Huse, E. T. J. Nibbering, T. Elsaesser, R. J. D. Miller, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 437–442.
- [124] P. Hamm, M. Lim, R. M. Hochstrasser, *Phys. Rev. Lett.* **1998**, *81*, 5326–5329.
- [125] M. Kozinski, S. Garrett-Roe, P. Hamm, *Chem. Phys.* **2007**, *341*, 5–10.
- [126] C. H. Kuo, R. M. Hochstrasser, *Chem. Phys.* **2007**, *341*, 21–28.
- [127] J. J. Sines, S. A. Allison, J. A. McCammon, *Biochemistry* **1990**, *29*, 9403–9412.
- [128] D. K. Jones-Hertzog, W. L. Jorgensen, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 1539–1549.
- [129] B. E. Cohen, T. B. McAnaney, E. S. Park, Y. N. Jan, S. G. Boxer, L. Y. Jan, *Science* **2002**, *296*, 1700–1703.
- [130] C. Fang, J. D. Bauman, K. Das, A. Remorino, E. Arnold, R. M. Hochstrasser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 1472–1477.
- [131] I. T. Suydam, S. G. Boxer, *Biochemistry* **2003**, *42*, 12050–12055.
- [132] A. Piryatinski, V. Chernyak, S. Mukamel, *Chem. Phys.* **2001**, *266*, 285–294.
- [133] D. V. Kurochkin, S. R. G. Naraharisetty, I. V. Rubtsov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 14209–14214.
- [134] Q. Shi, E. Geva, *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 9059–9069.
- [135] Y. S. Kim, R. M. Hochstrasser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 11185–11190.
- [136] J. R. Zheng, K. Kwak, J. Asbury, X. Chen, I. R. Piletic, M. D. Fayer, *Science* **2005**, *309*, 1338–1343.
- [137] J. Bredenbeck, J. Helbing, K. Nienhaus, G. U. Nienhaus, P. Hamm, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 14243–14248.
- [138] O. Golonzka, M. Khalil, N. Demirdoven, A. Tokmakoff, *J. Chem. Phys.* **2001**, *115*, 10814–10828.
- [139] T. Miyazawa, T. Shimanouchi, S. I. Mizushima, *J. Chem. Phys.* **1958**, *29*, 611–616.
- [140] M. Tsuboi, T. Onishi, I. Nakagawa, T. Shimanouchi, S. Mizushima, *Spectrochim. Acta* **1958**, *12*, 253–261.
- [141] S. Krimm, J. Bandekar, *Adv. Protein Chem.* **1986**, *38*, 181–364.
- [142] T. Hayashi, W. Zhuang, S. Mukamel, *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 9747–9759.
- [143] J. T. Pelton, L. R. McLean, *Anal. Biochem.* **2000**, *277*, 167–176.
- [144] *Infrared Spectroscopy of Biomolecules* (Hrsg.: H. H. Mantsch, D. Chapman), Wiley-Liss, New York, **1996**.
- [145] T. Wang, Y. J. Zhu, Z. Getahun, D. G. Du, C. Y. Huang, W. F. DeGrado, F. Gai, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 15301–15310.
- [146] H. Torii, M. Tasumi, *J. Raman Spectrosc.* **1998**, *29*, 81–86.
- [147] Siehe Lit. [142].
- [148] T. Hayashi, S. Mukamel, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 11032–11046.
- [149] Siehe Lit. [141].
- [150] H. Torii, M. Tasumi, *J. Chem. Phys.* **1992**, *96*, 3379–3387.
- [151] R. D. Gorbunov, D. S. Kosov, G. Stock, *J. Chem. Phys.* **2005**, *122*, 224904.
- [152] P. Hamm, S. Woutersen, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2002**, *75*, 985–988.
- [153] T. L. Jansen, A. G. Dijkstra, T. M. Watson, J. D. Hirst, J. Knoester, *J. Chem. Phys.* **2006**, *125*, 044312.
- [154] J. R. Cheeseman, M. J. Frisch, F. J. Devlin, P. J. Stephens, *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *252*, 211–220.
- [155] T. Hayashi, H. Hamaguchi, *Chem. Phys. Lett.* **2000**, *326*, 115–122.
- [156] K. A. Merchant, W. G. Noid, R. Akiyama, I. J. Finkelstein, A. Goun, B. L. McClain, R. F. Loring, M. D. Fayer, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13804–13818.
- [157] J. R. Hill, A. Tokmakoff, K. A. Peterson, B. Sauter, D. Zimdars, D. D. Dlott, M. D. Fayer, *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 11213–11219.
- [158] S. Ham, J. H. Kim, H. Lee, M. H. Cho, *J. Chem. Phys.* **2003**, *118*, 3491–3498.
- [159] K. Kwac, M. H. Cho, *J. Chem. Phys.* **2003**, *119*, 2247–2255.
- [160] J. R. Schmidt, S. A. Corcelli, J. L. Skinner, *J. Chem. Phys.* **2004**, *121*, 8887–8896.
- [161] T. M. Watson, J. D. Hirst, *Mol. Phys.* **2005**, *103*, 1531–1546.
- [162] T. Hayashi, S. Mukamel, *J. Chem. Phys.* **2006**, *125*, 194510.
- [163] T. L. Jansen, J. Knoester, *J. Chem. Phys.* **2006**, *124*, 044502.
- [164] W. Zhuang, D. Abramavicius, T. Hayashi, S. Mukamel, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 3362–3374.
- [165] B. R. Brooks, R. E. Brucoleri, B. D. Olafson, D. J. States, S. Swaminathan, M. Karplus, *J. Comput. Chem.* **1983**, *4*, 187–217.
- [166] Gaussian 03 (Revision c.01), Technical report, M. J. Frisch et al., **2003**.
- [167] J. Kubelka, T. A. Keiderling, *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 10922–10928.
- [168] Siehe Lit. [166].
- [169] T. Hayashi, S. Mukamel, *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 9113–9131.
- [170] T. Hayashi, S. Mukamel, *Bull. Korean Chem. Soc.* **2003**, *24*, 1097–1101.
- [171] L. C. Mayne, B. Hudson, *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 2962–2967.
- [172] H. Guo, M. Karplus, *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 7273–7287.
- [173] S. Ham, J. H. Kim, H. Lee, M. H. Cho, *J. Chem. Phys.* **2003**, *118*, 3491–3498.
- [174] D. Thouless, *Phys. Rep.* **1974**, *13*, 94–142.
- [175] M. L. Cowan, B. D. Bruner, N. Huse, J. R. Dwyer, B. Chugh, E. T. J. Nibbering, T. Elsaesser, R. J. D. Miller, *Nature* **2005**, *434*, 199–202.
- [176] I. V. Schweigert, S. Mukamel, *Phys. Rev. A* **2008**, *77*, 033802.
- [177] R. A. Marcus, *Adv. Chem. Phys.* **2007**, *106*, 1–6.
- [178] C. Fang, J. Wang, Y. S. Kim, A. K. Charnley, W. Barber-Armstrong, A. B. Smith, S. M. Decatur, R. M. Hochstrasser, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 10415–10427.
- [179] M. Kobus, R. D. Gorbunov, P. H. Nguyen, G. Stock, *Chem. Phys.* **2008**, *347*, 208–217.
- [180] R. Kubo, *J. Math. Phys.* **1963**, *4*, 174.
- [181] R. Kubo in *Advances in Chemical Physics*, Vol. XV: *Stochastic Processes in Chemical Physics* (Hrsg.: K. Schuler), Wiley, New York, **1969**, S. 101.
- [182] Y. Tanimura, *J. Phys. Soc. Jpn.* **2006**, *75*, 082001.
- [183] D. Gamliel, H. Levanon, *Stochastic Processes in Magnetic Resonance*, World Scientific, River Edge, **1995**.
- [184] J. H. Freed, G. V. Bruno, C. F. Polnaszek, *J. Phys. Chem.* **1971**, *75*, 3385.
- [185] D. J. Schneider, J. H. Freed in *Advances in Chemical Physics*, Vol. LXXIII: *Lasers, Molecules, and Methods* (Hrsg.: J. O. Hirschfelder, R. E. Wyatt, R. D. Coalson), Wiley, New York, **1989**, S. 387.
- [186] R. A. MacPhail, R. G. Snyder, H. L. Strauss, *J. Chem. Phys.* **1982**, *77*, 1118–1137.
- [187] J. J. Turner, C. M. Gordon, S. M. Howdle, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 17532–17538.
- [188] F. Sanda, S. Mukamel, *J. Chem. Phys.* **2006**, *125*, 014507.
- [189] S. Woutersen, P. Hamm, *J. Chem. Phys.* **2001**, *114*, 6833–6840.
- [190] R. Schweitzer-Stenner, *Biophys. J.* **2002**, *83*, 523–532.
- [191] R. Schweitzer-Stenner, F. Eker, Q. Huang, K. Griebenow, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 9628–9633.
- [192] S. Woutersen, R. Pfister, P. Hamm, Y. Mu, D. S. Kosov, G. Stock, *J. Chem. Phys.* **2002**, *117*, 6833–6840.
- [193] K. Kwac, M. H. Cho, *J. Chem. Phys.* **2003**, *119*, 2256–2263.
- [194] T. L. Jansen, W. Zhuang, S. Mukamel, *J. Chem. Phys.* **2004**, *121*, 10577–10598.
- [195] Y. Mu, D. S. Kosov, G. Stock, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 5064–5073.
- [196] M. Fayer, persönliche Mitteilung.
- [197] D. Eisenberg, W. Kauzmann, *The Structure and Properties of Water*, Oxford University Press, New York, **1969**.



- [198] *The Hydrogen Bond: Recent Developments in Theory and Experiments, Vol. 1–3* (Hrsg.: P. Schuster, G. Zundel, C. Sandorfy), North-Holland, Amsterdam, **1976**.
- [199] P. Wernet, D. Nordlund, U. Bergmann, M. Cavalleri, M. Odelius, H. Ogasawara, L. A. Naslund, T. K. Hirsch, L. Ojamae, P. Glatzel, L. G. M. Pettersson, A. Nilsson, *Science* **2004**, *304*, 995–999.
- [200] A. H. Romero, P. L. Silvestrelli, M. Parrinello, *J. Chem. Phys.* **2001**, *115*, 115–123.
- [201] E. D. Isaacs, A. Shukla, P. M. Platzman, D. R. Hamann, B. Barbiellini, C. A. Tulk, *Phys. Rev. Lett.* **1999**, *82*, 600–603.
- [202] M. Bernasconi, P. L. Silvestrelli, M. Parrinello, *Phys. Rev. Lett.* **1998**, *81*, 1235–1238.
- [203] A. Luzar, D. Chandler, *Nature* **1996**, *379*, 55–57.
- [204] S. Woutersen, H. J. Bakker, *Nature* **1999**, *402*, 507–509.
- [205] J. H. Guo, Y. Luo, A. Augustsson, J. E. Rubensson, C. Sathe, H. Agren, H. Siegbahn, J. Nordgren, *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *89*, 137402.
- [206] *Ultrafast Hydrogen Bonding Dynamics and Proton Transfer Processes in the Condensed Phase* (Hrsg.: T. Elsaesser, H. J. Bakker), Kluwer, Dordrecht, **2002**.
- [207] R. Laenen, C. Rauscher, A. Laubereau, *Phys. Rev. Lett.* **1998**, *80*, 2622–2625.
- [208] J. Stenger, D. Madsen, P. Hamm, E. T. J. Nibbering, T. Elsaesser, *Phys. Rev. Lett.* **2001**, *87*, 027401.
- [209] R. Rey, K. B. Møller, J. T. Hynes, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 1915–1928.
- [210] C. P. Lawrence, J. L. Skinner, *J. Chem. Phys.* **2002**, *117*, 5827–5838.
- [211] M. Falk, T. A. Ford, *Can. J. Phys.* **1966**, *44*, 1699–1714.
- [212] Lit. [211].
- [213] S. Yermenko, M. S. Pshenichnikov, D. A. Wiersma, *Chem. Phys. Lett.* **2003**, *369*, 107–113.
- [214] W. S. Benedicht, N. Gailar, E. K. Plyler, *J. Chem. Phys.* **1956**, *24*, 1139–1165.
- [215] S. Woutersen, H. J. Bakker, *Phys. Rev. Lett.* **1999**, *83*, 2077–2080.
- [216] H. Graener, G. Seifert, A. Laubereau, *Phys. Rev. Lett.* **1991**, *66*, 2092–2095.
- [217] R. Laenen, K. Simeonidis, A. Laubereau, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 408–417.
- [218] S. Bratos, J.-Cl. Leicknam, *J. Chem. Phys.* **1994**, *101*, 4536–4546.
- [219] A. J. Lock, S. Woutersen, H. J. Bakker, *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 1238–1243.
- [220] J. Stenger, D. Madsen, P. Hamm, E. T. J. Nibbering, T. Elsaesser, *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 2341–2350.
- [221] J. Stenger, D. Madsen, J. Dreyer, P. Hamm, E. T. J. Nibbering, T. Elsaesser, *Chem. Phys. Lett.* **2002**, *354*, 256–263.
- [222] A. Piryatinski, C. P. Lawrence, J. L. Skinner, *J. Chem. Phys.* **2003**, *118*, 9672–9679.
- [223] T. Steinell, J. B. Asbury, S. A. Corcelli, C. P. Lawrence, J. L. Skinner, M. D. Fayer, *Chem. Phys. Lett.* **2004**, *386*, 295–300.
- [224] F. Ding, M. T. Zanni, *Chem. Phys.* **2007**, *341*, 95–105.
- [225] S. Garrett-Roe, P. Hamm, *J. Chem. Phys.* **2008**, *128*, 104507.
- [226] T. Hayashi, T. L. Jansen, W. Zhuang, S. Mukamel, *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 64–82.
- [227] T. L. Jansen, T. Hayashi, W. Zhuang, S. Mukamel, *J. Chem. Phys.* **2005**, *123*, 114504.
- [228] C. P. Lawrence, J. L. Skinner, *J. Chem. Phys.* **2003**, *118*, 264–272.
- [229] F. Csajka, D. Chandler, *J. Chem. Phys.* **1998**, *109*, 1125–1133.
- [230] R. Laenen, C. Rauscher, A. Laubereau, *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 9304–9311.
- [231] I. R. Piletic, D. E. Moilanen, D. B. Spry, N. E. Levinger, M. D. Fayer, *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 4985–4999.
- [232] V. V. Volkov, D. J. Palmer, R. Righini, *Phys. Rev. Lett.* **2007**, *99*, 078302.
- [233] D. Cringus, A. Bakulin, J. Lindner, P. Vohringer, M. S. Pshenichnikov, D. A. Wiersma, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 14193–14207.
- [234] Y. R. Shen, *The Principles of Nonlinear Optics*, Wiley, New York, **1984**.
- [235] Y. R. Shen, *Nature* **1989**, *337*, 519–525.
- [236] X. Chen, T. Yang, S. Kataoka, P. S. Cremer, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12272–12279.
- [237] M. Sovago, R. K. Campen, G. W. H. Wurpel, M. Müller, H. J. Bakker, M. Bonn, *Phys. Rev. Lett.* **2008**, *100*, 173901.
- [238] A. Paarmann, T. Hayashi, S. Mukamel, R. J. D. Mirrer, *J. Chem. Phys.* **2008**, *128*, 191103.
- [239] J. Park, J. H. Ha, R. M. Hochstrasser, *J. Chem. Phys.* **2004**, *121*, 7281–7292.
- [240] J. H. Ha, Y. S. Kim, R. M. Hochstrasser, *J. Chem. Phys.* **2006**, *124*, 064508.
- [241] M. Lima, V. Volkov, P. Foggi, R. Chelli, R. Righini, *Biophysics* **2005**, *45*, S85.
- [242] A. M. Dokter, S. Woutersen, H. J. Bakker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 15355–15358.
- [243] H. S. Tan, I. R. Piletic, M. D. Fayer, *J. Chem. Phys.* **2005**, *122*, 174501.
- [244] H. S. Tan, I. R. Piletic, R. E. Riter, N. E. Levinger, M. D. Fayer, *Phys. Rev. Lett.* **2005**, *94*, 057405.
- [245] I. R. Piletic, H. S. Tan, M. D. Fayer, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 21273–21284.
- [246] A. M. Dokter, S. Woutersen, H. J. Bakker, *Phys. Rev. Lett.* **2005**, *94*, 178301.
- [247] V. V. Volkov, D. J. Palmer, R. Righini, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 1377–1383.
- [248] A. Ghosh, M. Smits, J. Bredenbeck, M. Bonn, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 9608–9609.
- [249] G. Otting, E. Liepinsh, K. Wüthrich, *Science* **1991**, *254*, 974–980.
- [250] S. K. Pal, A. H. Zewail, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 2099–2123.
- [251] S. Habuchi, H. B. Kim, N. Kitamura, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 366–372.
- [252] G. Sposito, N. T. Skipper, R. Sutton, S. H. Park, A. K. Soper, J. A. Greathouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 3358–3364.
- [253] B. Albert, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Molecular Biology of the Cell*, Garland, New York, **2000**.
- [254] K. Simons, E. Ikonen, *Nature* **1997**, *387*, 569–572.
- [255] R. Mendelsohn, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1972**, *290*, 15–21.
- [256] M. R. Bunow, I. W. Levin, *Biochim. Biophys. Acta Lipids Lipid Metab.* **1977**, *489*, 191–206.
- [257] S. F. Bush, H. Levin, I. W. Levin, *Chem. Phys. Lipids* **1980**, *27*, 101–111.
- [258] E. Bicknell-Brown, K. G. Brown, W. B. Person, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 5486–5491.
- [259] E. Mushayakarara, I. W. Levin, *J. Phys. Chem.* **1982**, *86*, 2324–2327.
- [260] W. Hübner, H. H. Mantsch, *Biophys. J.* **1991**, *59*, 1261.
- [261] R. N. Lewis, R. N. McElhaney, W. Pohle, H. H. Mantsch, *Biophys. J.* **1994**, *67*, 2367–2375.
- [262] P. B. Hitchcock, R. Mason, K. M. Thomas, G. G. Shipley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1974**, *71*, 3036–3040.
- [263] R. H. Pearson, I. Pascher, *Nature* **1979**, *281*, 499–501.
- [264] H. Hauser, I. Pascher, R. H. Pearson, S. Sundell, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Biomembr.* **1981**, *650*, 21–51.
- [265] E. Mushayakarara, N. Albon, I. W. Levin, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1982**, *686*, 153–159.
- [266] A. Blume, W. Hübner, G. Messner, *Biochemistry* **1988**, *27*, 8239–8249.

- [267] R. N. Lewis, R. N. McElhaney, *Biophys. J.* **1992**, *61*, 63–77.
- [268] V. Volkov, F. Nuti, Y. Takaoka, R. Chelli, A. M. Papini, R. Righini, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9466–9470.
- [269] P. F. Tian, D. Keusters, Y. Suzuki, W. S. Warren, *Science* **2003**, *300*, 1553–1555.
- [270] X. M. Yuan, A. K. Downing, V. Knott, P. A. Handford, *EMBO J.* **1997**, *16*, 6659–6666.
- [271] R. W. W. N. Berova, R. W. Woody, K. Nakanishi, *Circular Dichroism. Principles and Applications*, 2. Aufl., Wiley, New York, **2000**.
- [272] L. A. Nafle, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1997**, *48*, 357–386.
- [273] L. D. Barron, *Molecular Light Scattering and Optical Activity*, 2. Aufl., Cambridge University Press, Cambridge, **2004**.
- [274] K. K. Lee, C. Joo, S. Yang, H. Han, M. Cho, *J. Chem. Phys.* **2007**, *126*, 054505.
- [275] J. H. Choi, M. Cho, *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 5176–5184.
- [276] L. D. Barron, L. Hecht, E. W. Blanch, A. F. Bell, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2000**, *73*, 1–49.
- [277] R. D. Singh, T. A. Keiderling, *Biopolymers* **1981**, *20*, 237–240.
- [278] B. B. Lal, L. A. Nafle, *Biopolymers* **1982**, *21*, 2161–2183.
- [279] A. C. Sen, T. A. Keiderling, *Biopolymers* **1984**, *23*, 1519–1532.
- [280] S. C. Yasui, T. A. Keiderling, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 5576–5581.
- [281] S. C. Yasui, T. A. Keiderling, *Biopolymers* **1986**, *25*, 5–15.
- [282] S. C. Yasui, T. A. Keiderling, G. M. Bonora, C. Toniolo, *Biopolymers* **1986**, *25*, 79–89.
- [283] D. G. Du, Y. J. Zhu, C. Y. Huang, F. Gai, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 15915–15920.
- [284] K. Schulten, persönliche Mitteilung.
- [285] R. Tycko, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 500–506.
- [286] M. A. Findeis, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2000**, *1502*, 76–84.
- [287] J. Kang, H. G. Lemaire, A. Unterbeck, J. M. Salbaum, C. L. Masters, K. H. Grzeschik, G. Multhaup, K. Beyreuther, B. Müller-Hill, *Nature* **1987**, *325*, 733–736.
- [288] D. Burdick, B. Soreghan, M. Kwon, J. Kosmoski, M. Knauer, A. Henschen, J. Yates, C. Cotman, C. Glabe, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 546–554.
- [289] M. Knauer, B. Soreghan, D. Burdick, J. Kosmoski, C. Glabe, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 7437–7441.
- [290] T. Luhrs, C. Ritter, M. Adrian, D. Riek-Loher, B. Bohrmann, H. Doeli, D. Schubert, R. Riek, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 17342–17347.
- [291] D. Voronine, D. Abramavicius, S. Mukamel, *J. Chem. Phys.* **2008**, *128*, 3613–3619.
- [292] *Theory, Modelling and Evaluation of Single Molecule Measurements* (Hrsg.: E. Barkai, M. Orrit, F. Brown H. Yang), World Scientific, Singapore, **2008**.
- [293] P. Hamm, S. M. Ohline, W. Zinth, *J. Chem. Phys.* **1997**, *106*, 519–529.
- [294] P. L. Geissler, C. Dellago, D. Chandler, J. Hutter, M. Parrinello, *Science* **2001**, *291*, 2121–2124.
- [295] H. Maekawa, W. Zhuang, C. Toniolo, S. Mukamel, D. J. Tobias, N.-H. Ge, *J. Phys. Chem. B*, im Druck.
- [296] J. C. Phillips, R. Braun, W. Wang, J. Gumbart, E. Tajkhorshid, E. Villa, C. Chipot, R. D. Skeel, L. Kale, K. Schulten, *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1781–1802.
- [297] In der NMR-Spektroskopie ist dies nicht der Fall (siehe Tabelle 1), da hier das Signal in allen Raumrichtungen erzeugt wird.