

Beobachtung einer DNA-Ligand-Schwingung über zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung**

Mohsen Sajadi, Kristina E. Furse, Xin-Xing Zhang, Lars Dehmel, Sergey A. Kovalenko, Steven A. Corcelli* und Nikolaus P. Ernsting*

Niederfrequente Strukturschwingungen von Proteinen und DNA sind wichtig für ihre physiologische Funktion, und diese Bewegungen werden verändert, wenn Biomoleküle miteinander oder mit Liganden wechselwirken. Als Modell betrachten wir den DNA-Duplex d(CGCAAATTTGCG)₂ zusammen mit dem Bis(benzimidazol)-Farbstoff Hoechst 33258 (H33258), der A:T-reiche Regionen in der kleinen Furche erkennt und daran bindet.^[1,2] Dynamische Aspekte der Erkennung werden zunehmend als wesentlich für inter- und intramolekulare Signalnetzwerke,^[3] Enzymkatalyse^[4] und allosterische Regulation^[5] erkannt. Verbesserte Strategien zur Wirkstoffsuche berücksichtigen ebenfalls die Flexibilität der biomolekularen Zielstruktur.^[6] Aber trotz ihrer Bedeutung wurde eine Schwingung entlang der Koordinate für biomolekulare Erkennung noch nicht beobachtet. Denn erstens ist Infrarot-Spektroskopie nicht selektiv genug für die Bindung, und zweitens wird stationäre Raman-Spektroskopie bei niedrigen Wellenzahlen (\approx THz oder 30 cm^{-1}) von Rayleigh-Streuung dominant überlagert. Wir schlagen stattdessen vor, Bindungssoszillationen mithilfe der Fluoreszenz des Liganden zu beobachten. Die zeitabhängige Stokes-Verschiebung („time-dependent Stokes shift“, TDSS) der Fluoreszenzbande zeigt eine Modulation, welche die kohärente Auf- und Abbewegung des Liganden widerspiegelt, mit Atmung der kleinen Furche.^[7] Die Beobachtungsmethode ist räumlich selektiv und empfindlich, verglichen mit THz-Absorptionsmessungen, und könnte wichtig werden aufgrund neuerer Entwicklungen zur Fluoreszenz-Zeitauflösung.^[8,9]

Abbildung 1 zeigt die Röntgenkristallstruktur des DNA:H33258-Komplexes.^[1] Die Imidgruppen HN1 und HN3 bilden verzweigte Wasserstoffbrücken mit den Kanten T O2

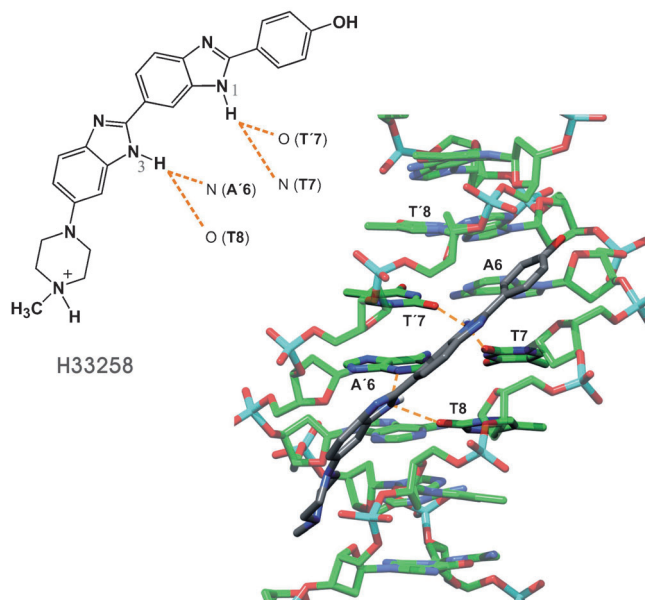


Abbildung 1. Sicht auf die kleine Furche von d(CGCAAATTTGCG)₂ mit gebundenem H33258. Dessen Imido-Gruppen bilden je zwei Wasserstoffbrücken zu Nukleobase-Kanten im Furchenboden (zur Bezeichnung siehe Lit. [23]). Wir zeigen, dass die H-Brücken-Abstände und Furchenbreite kohärent schwingen, wenn der Chromophor optisch angeregt wird. Die Bewegung wird mittels Fluoreszenz beobachtet, und zwar als Frequenzmodulation der zeitabhängigen Stokes-Verschiebung.

und A N3 im Furchenboden; sie spielen eine wichtige Rolle bei der molekularen Erkennung.^[1,2] Wir regen den Liganden mit kurzen optischen Pulsen an und verfolgen die gesamte Fluoreszenzbande, in ihrer Zeitentwicklung, über mehrere Pikosekunden. Dazu wird die Emission in einem verschiebbaren 85-fs-Zeitfenster mit Nahinfrarotlicht gemischt, insgesamt in den UV-Bereich hochkonvertiert (durch Summenfrequenz-Erzeugung) und dort breitbandig aufgenommen.^[10] Allgemein reflektiert der TDSS die Antwort der lokalen Umgebung auf eine plötzliche elektrostatische Störung, hervorgerufen durch die elektronische Anregung eines geeigneten Sondenmoleküls. Für ein Oxychinolinium-Betain in verschiedenen Lösungsmitteln wurden nicht nur intramolekulare Schwingungen des Sondenmoleküls gesehen, sondern auch kohärente Bewegungen des Solvens.^[11] Wenn die fluoreszente Sonde zudem spezifisch bindet, darf man hoffen, sogar die Oszillation der Bindungslänge zu beobachten. Doch in allen entsprechenden Studien von Proteinen und natürlicher DNA wurden nur multiexponentielle oder ähnliche Stokes-Verschiebungen gefunden, entsprechend einer diffusiven Reor-

[*] M. Sajadi, X.-X. Zhang, L. Dehmel, Dr. S. A. Kovalenko, Prof. Dr. N. P. Ernsting
Institut für Chemie, Humboldt Universität zu Berlin
12489 Berlin (Deutschland)
E-Mail: nernst@chemie.hu-berlin.de

Dr. K. E. Furse, Prof. Dr. S. A. Corcelli
Department of Chemistry and Biochemistry
University of Notre Dame
Notre Dame, Indiana 46556 (USA)
E-Mail: scorcell@nd.edu

X.-X. Zhang
Teda Applied Physics School, Nankai University, Tianjin (China)

[**] Wir danken der National Science Foundation und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für finanzielle Unterstützung (Projekt CHE-0845736 von S.A.C. und ER 154/9-1 von N.P.E.) sowie dem Chinese Scholarship Council für ein Stipendium an X.-X.Z.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201102942> zu finden.

ganisation der Umgebung.^[12–21] Die Debatte konzentrierte sich deshalb auf die Zeitskalen 1 ps–100 ns und auf die Frage, inwieweit das Biomolekül selbst oder die Wasserumgebung zur Reorganisation beitragen.^[22–25] Inzwischen wurden die experimentellen Methoden verbessert und schließlich eine oszillatorische TDSS-Komponente gefunden, allerdings mit nichtnatürlicher DNA, in der eine Nukleobase durch die Sonde ersetzt worden war und wofür eine Ligandenkoordinate nicht offensichtlich ist.^[26] Hier berichten wir über solche Oszillationen von DNA:H33258. Ihre Zuordnung zu spezifischen und gekoppelten Moden erfolgt mithilfe von Moleküldynamik(MD)-Simulationen.^[27–29]

Abbildung 2a zeigt stationäre Spektren von H33258. Durch Bindung an den Duplex wird die Absorptionsbande ins Rote verschoben und verbreitert, verglichen mit wässriger Lösung. Aus technischen Gründen benutzen wir eine relativ hohe Konzentration (0.7 mM) des Komplexes. In diesem Fall erscheint die Emissionsbande rotverschoben von der Position bei niedriger Konzentration, aufgrund von Heterogenität (Farbstoff-Beladung) und Selbstabsorption.^[30] Aber unabhängig von diesen Komplikationen bewirkt optische Anregung mit Femtosekundenpulsen an der roten Bandkante (400 nm), dass gebundene H33258-Chromophore in den ersten elektronisch angeregten Singulett-Zustand S₁ gepumpt werden. Wir interessieren uns besonders für die ersten Pikosekunden der spektralen Relaxation nach der Anregung.

Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektren S₁ → S₀, wie gemessen, zeigt Abbildung 2b. Die Emission wurde gleichzeitig bei allen relevanten Wellenlängen registriert und mit derjenigen von Standard-Farbstoffen verglichen. Wir erhalten so die Verteilung von Photonen über Fluoreszenzwellenzahlen.^[10] Eine spektrale Mulde bei 530 nm wird durch starke S_n ← S₁-Absorption verursacht.^[31] Diese Art des „inneren Filtereffektes“ kann mit Kenntnis der entsprechenden Bandenform (Abbildung 2c) und Amplitude (Vergleich von Spektren im quasistationären Zustand bei später Zeit) korrigiert werden. Ähnlich wird der innere Filtereffekt aufgrund der Absorption des Grundzustandes abgeschätzt. Nach der Korrektur erhält man die „wahren“ Quantenverteilungen in Abbildung 2d.

Die Fluoreszenzfrequenz als Funktion der Zeit ist in Abbildung 3 dargestellt. Hier zeigt Abbildung 3a die Position $\nu_p(t)$ des Bandenmaximums für 20 °C und 1 °C (von lognorm-Beschreibungen der Spektren in Abbildung 2d). Ähnlich kann man die mittlere Frequenz $\bar{\nu}(t)$ benutzen; es gibt keinen theoretischen Grund, weshalb das eine oder andere Maß bevorzugt sein sollte. Für Anregung an der roten Absorptionskante liefern beide Größen dieselbe Dynamik. Die $\nu_p(t)$ -Kurve für 20 °C wird mit einer Gauß-Funktion und bis zu drei Exponentialfunktionen beschrieben (siehe Hintergrundinformationen). Das Ergebnis stimmt qualitativ überein mit Summenfrequenzdaten zum (verschiedenen) verdünnten System.^[20]

Die Entdeckung einer Frequenzmodulation (FM) während der ersten Pikosekunden steht im Zentrum dieser Arbeit. Zu diesem Zweck ist die Berechnung von $\bar{\nu}(t)$ direkt aus den gemessenen Spektren (wie in Abbildung 2b) vorzuziehen. Das frühe Verhalten zeigt Abbildung 3b. Wenn die Temperatur von 20 °C auf 1 °C erniedrigt wird, erscheinen

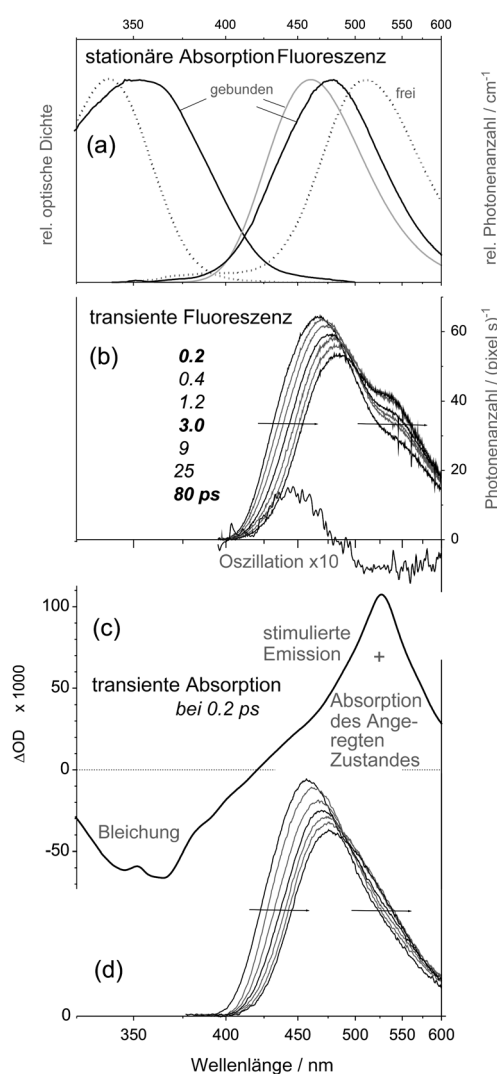


Abbildung 2. Optische Spektren des DNA:H33258-Komplexes in Wasser (pH 7.4). a) Stationäre Absorption und Fluoreszenz bei 20 °C. Graue Linie: Fluoreszenz bei niedriger Konzentration. Schwarze durchgezogene Linien: bei 0.7 mM Duplex-Konzentration und 400 nm Anregung. b) Transiente Fluoreszenz nach Femtosekunden(fs)-Laser-Anregung bei 400 nm, 1 °C, 0.7 mM, mit 85-fs-Zeitauflösung (volle Halbwertsbreite der Apparatefunktion). Gezeigt sind die gemessenen Spektren unmittelbar nach photometrischer Korrektur, welche durch Vergleich mit Standard-Farbstoffen erfolgt. Das Spektrum einer Frequenzmodulation, welche Rekursionen bei 0.6 und 1.2 ps aufweist, ist auch dargestellt (siehe Text). c) Transiente Absorption nach fs Anregung.^[31] Absorption aus dem angeregten Zustand, bei 530 nm, bewirkt die entsprechende Mulde in den gemessenen transienten Fluoreszenzspektren („innerer Filtereffekt“). d) Transiente Fluoreszenzspektren bei 1 °C, erhalten aus (b) mittels Glättung über 3 Pixel und Korrektur des inneren Filtereffekts. Die dynamische Rotverschiebung der Bande (Pfeile) wird gemessen über die Frequenz $\nu_p(t)$ des Maximums oder über die mittlere Frequenz $\bar{\nu}(t)$.

schwache Oszillationen auf der diffusen Relaxationskurve (weil die kohärente Kernbewegung, welche später verantwortlich gemacht wird, weniger Reibung erfährt). Ein Vergleich der beiden Kurven zeigt, dass die Oszillationen bei 1 °C signifikant sind. Die spektrale Veränderung, welche $\bar{\nu}(t)$ zugrunde liegt, wird am besten mit einem globalen Angleich,

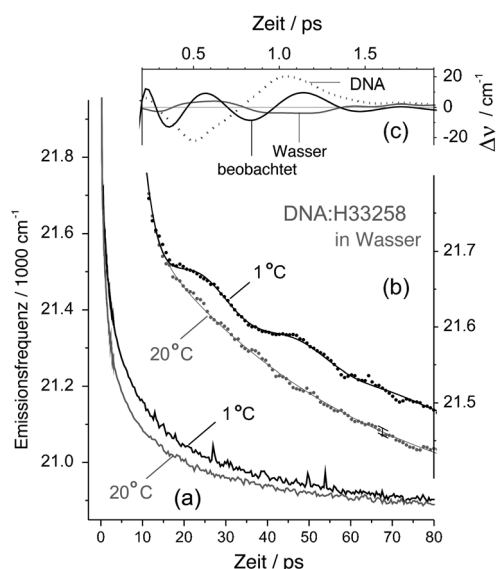


Abbildung 3. Zeitabhängige Stokes-Verschiebung von DNA:H33258 in Wasser (0.7 mm). a) Frequenz ν_p des Maximums, von Angleichen der Fluoreszenzbanden wie in Abbildung 2d mit einer spektralen lognorm-Funktion. Wegen besserer Statistik ist das Rauschen geringer vor 10 ps. b) Mittlere Frequenz $\bar{\nu}$ (Punkte), welche direkt – unter Vermeidung von spektralen Angleichen – aus gemessenen Spektren wie in Abbildung 2b bestimmt werden kann. Ein konstanter Wert wurde addiert, um mit ν_p vergleichbare Werte zu erreichen. Bei Temperaturerniedrigung auf 1 °C erscheinen schwache Oszillationen auf einer diffusen spektralen Relaxationskurve. Glatte $\bar{\nu}$ -Verläufe wurden mithilfe eines globalen Angleichs (t, ν) gewonnen (durchgezogene Linien), und das Konfidenz-Interval ist angedeutet. c) Restkurve zwischen der schwarzen Linie in (b) und ihrem triexponentiellen Angleich (schwarze durchgezogene Linie). Ebenso wurden Restkurven für die simulierte Zeitkorrelationsfunktion $C_{\text{DNA}}(t)$ (gepunktet) und $C_{\text{water}}(t)$ (grau) berechnet. Sie wurden mit der beobachteten gesamten Stokes-Verschiebung skaliert (Abbildung S8) und beschreiben die Schwankungen der Emissionsfrequenz, welche für die zwei Relaxationskanäle erwartet werden. Multiexponentielle Angleiche wurden beschränkt auf $t = 0.1$ –10 ps. Für (c) wurde die Ordinate von (b) $2 \times$ gestreckt.

d.h. gleichzeitig für alle Wellenlängen, erschlossen. Dazu wurden eine zeitliche Gauß-Funktion und 3 Exponentialfunktionen benutzt. Die oszillatorische Komponente bei 1 °C konnte (nach vielen Versuchen) am einfachsten durch die Funktion $s(t) = \xi \exp[-\gamma_1 t] \cos[\omega_1 t] + \exp[-\gamma_2 t] \cos[\omega_2 t]$ erfasst werden. Optimale Parameterwerte sind $\xi = 0.2$, $\omega_1 = 5.4 \text{ ps}^{-1}$, $\gamma_1 = 0.85$, $\omega_2 \approx 2\omega_1$, $\gamma_2 = 1.71 \text{ ps}^{-1}$. Wir probierten auch nur eine einzige Frequenz, doch in diesem Fall wird die beobachtete Dämpfung nicht gut wiedergegeben und auch nicht das Verhalten in Ethylenglycol (siehe unten). Das Spektrum, welches mit $s(t)$ assoziiert ist, wird in Abbildung 2b auch gezeigt; es hat eine dispersive Form mit Nulldurchgang nahe dem Fluoreszenzmaximum, wie erwartet für FM. Sehr wahrscheinlich bedeutet die Oszillation eine kohärente supramolekulare Schwingung, wie im Folgenden begründet wird.

Über MD-Simulationen von DNA:H33258 wurde von einigen von uns bereits berichtet.^[27–29] Die berechnete Solvationsrelaxationsfunktion, $C(t)$, konnte in Beiträge der Umgebung (DNA, Wasser, Gegenionen) und der intramole-

kularen Konformationen des H22358-Solvats zerlegt werden: $C(t) = C_{\text{DNA}}(t) + C_{\text{water}}(t) + C_{\text{ions}}(t) + C_{\text{conf}}(t)$. Hochfrequente Oszillationen der partiellen $C_i(t)$ werden durch intramolekulare Bewegung verursacht (siehe Hintergrundinformationen, Abbildung S7). Das darunterliegende langsame Verhalten von $C_{\text{DNA}}(t)$ zeigt ein lokales Maximum bei etwa 1.05 ps. Für $C_{\text{water}}(t)$ hat das langsame Verhalten eine sehr schwache Schulter bei 0.6 ps. Oszillationen sieht man besser, wenn ein multiexponentieller Abgleich von jeder geglätteten Kurve abgezogen wird. Die resultierenden $\Delta C_i(t)$ werden sodann mit dem Faktor skaliert, welcher das gesamte $C(t)$ an die beobachtete spektrale Verschiebung anpasst; das Ergebnis zeigt Abbildung 3c. Modulation der Fluoreszenzfrequenz wird vorhergesagt für Solvation durch DNA (gepunktete Linie) und, in geringerem Maß, durch Wasser (grau). Der Beitrag der Gegenionen ist strukturlos im betrachteten Zeitbereich, und Konformationsänderungen des Solvats selbst tragen vernachlässigbar wenig bei.

Ein Vergleich mit dem Experiment (schwarze Punkte und Linien in Abbildung 3b,c) zeigt, dass die Amplitude und Zeitskala der simulierten FM zu denjenigen der beobachteten FM passen. Die qualitativen Züge werden durch die MD offenbar gut beschrieben, während die simulierten Werte vom Kraftfeld abhängen. Der DNA-Beitrag wird als gleich groß oder größer als derjenige des Wassers vorhergesagt, und seine Rekurrenz bei 1.05 ps stimmt mit der gemessenen Rekurrenz von 1.1 ps gut überein. Die Simulation von H33258 allein in Wasser zeigt überhaupt keine Rekurrenz. Somit kann die Welle $\exp[-\gamma_1 t] \cos[\omega_1 t]$ der Kohärenz in einer 29-cm^{-1} -Strukturmode des Komplexes zugeordnet werden.

Eine Betrachtung der Koordinaten zeigt, dass die Bindungslängen der beiden (zweifachen) H-Brücken ebenfalls mit einer 1.05-ps-Periode oszillieren. Weil die Emission des Chromophors sich mit der Bindung verschiebt (Abbildung 2a), sollte diese Bewegung mit der Oszillation der berechneten $C_{\text{DNA}}(t)$ -Kurve assoziiert sein (und deshalb mit der beobachteten Frequenzmodulation). Ähnlich könnte die Breite der kleinen Furche (Abbildung S10) beteiligt sein. Sie wird definiert als der Abstand zwischen gegenüberliegenden Phosphoratomen, wobei dasjenige im Gegenstrang zu einem um vier verschobenen Basenpaar gehört. Für den zentralen Teil erhält man z.B. die Abstände A6–C11', T7–G10', T8–T9', T9–T8', G10–T7' und C11–A6'. Ihre Zeitkorrelationsfunktionen („time correlation functions“, TCF, Abbildung S10) zeigen eine Rekurrenz bei 1 ps. Offenbar wird die zentrale Region insgesamt von einer kohärenten Bewegung erfasst, deren Frequenz nah bei der beobachteten liegt. Ein Vergleich von TCFs mit und ohne Farbstoffmolekül zeigt mehrere Unterschiede. Am wichtigsten ist, dass die Rekurrenz bei 1 ps verschwindet, wenn der Farbstoff nicht gebunden ist. In letzterem Fall nehmen die TCFs auch schneller ab, was bedeutet, dass die Flexibilität des DNA-Duplex durch die Komplexbildung verändert wird. Insgesamt kann geschlossen werden, dass die beobachtete Frequenzmodulation eine Schwingung entlang der Koordinate für biomolekulare Erkennung widerspiegelt.

Die Beobachtung von zwei FM-Termen könnte auf verschiedene Farbstoffspezies hindeuten. Doch diese Möglichkeit wird ausgeschlossen, weil eine komplexe Oszillations-

antwort auch mit verdünnter Lösung gefunden wird (siehe Hintergrundinformationen). Die MD-Simulationen legen nahe, dass die 0.6-ps-Rekurrenz dem Wasser zuzuordnen ist. Zwar wurde dessen Amplitude zu klein berechnet, verglichen mit derjenigen von DNA, sodass beide berechneten Terme zusammen nicht die beobachtete Doppelmaximum-Form ergeben (schwarze Linien in Abbildung 3c). Das Ungleichgewicht der beiden berechneten Terme könnte auf ein unstimuliertes Kraftfeld zurückzuführen sein, oder auf Vereinfachungen, die zur Berechnung der Antwortfunktion nötig waren.^[29] Ebenfalls könnte die experimentelle Kurve ungenau sein, weil sie als Restkurve zu einem stark abfallenden Untergrund bestimmt wurde (vergleiche Abbildung 3b). Deshalb bleibt kohärente, kollektive Wasserbewegung eine mögliche Erklärung, die weiter unten fortgeführt werden wird. Zuvor soll aber eine andere Erklärung erläutert werden: dass nämlich das lokale Maximum bei 0.6 ps einen Oberton der DNA-Schwingung darstellt. Dazu betrachten wir Abbildung 4.

Optische Anregung $S_1 \leftarrow S_0$ des Liganden H33258 ist prinzipiell begleitet von einer Strukturänderung des gesamten Komplexes. Entlang einer „Koordinate für molekulare Erkennung“, mit charakteristischer Frequenz von 29 cm^{-1} , wird das Minimum der potentiellen Energie z.B. um $\Delta \neq 0$ verschoben (Abbildung 4a). In diesem Fall wird ein einfaches Wellenpaket im S_1 -Zustand erzeugt, welches die Energie des Übergangs $S_1 \rightarrow S_0$ bei der Fundamentalfrequenz ω_1 moduliert. Eine andere Situation ist in Abbildung 4b dargestellt. Hier wird die Mode durch die Anregung nicht verschoben ($\Delta = 0$); stattdessen ändert sich die Kraftkonstante. Die anfänglich Gauß-Verteilung im elektronisch angeregten Zustand S_1 entwickelt sich in eine bimodale Verteilung und wieder zurück. Dies bewirkt eine Modulation der Emissionsenergie beim Oberton $2\omega_1$, was die 0.6-ps-Rekurrenz erklären würde.

Mit einem letzten Experiment erkunden wir die andere Hypothese: dass Wasser die 0.6-ps-Rekurrenz der zeitaufgelösten Emissionsfrequenz verursacht. Würde dieser Term verschwinden, wenn Wasser entfernt wird? Die Hybridisierung eines 21meren Oligonukleotids in Ethylenglycol erfolgte bei erniedrigter Temperatur.^[32] Für das hier behandelte

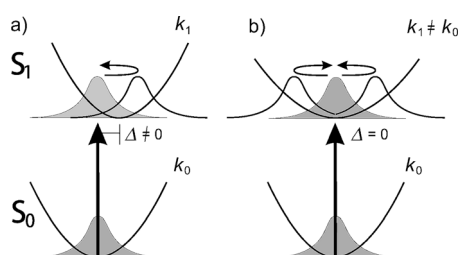


Abbildung 4. Modulation der Emissionsfrequenz infolge von Kohärenz in einer „Erkennungs“-Mode (gebogene Pfeile). a) Die Gleichgewichtsstruktur wird durch optische Anregung verändert. In diesem Fall wird ein einfaches Wellenpaket erzeugt, und man beobachtet eine Modulation bei der Fundamentalschwingung von 29 cm^{-1} . b) Die Struktur bleibt erhalten (Verschiebung $\Delta = 0$) aber die Kraftkonstante wird verändert. In diesem Fall wird das Wellenpaket bimodal, und man beobachtet eine Modulation bei der doppelten Schwingung (58 cm^{-1}).

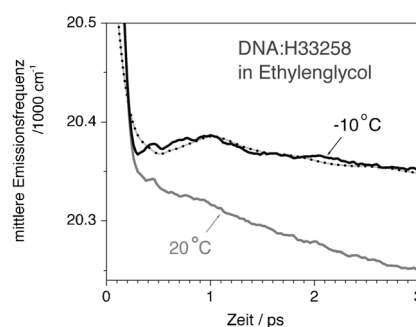


Abbildung 5. Stokes-Verschiebung der DNA:H33258-Fluoreszenz in Ethylenglycol (mittlere Frequenzen von Spektren wie in Abbildung 2b). Bei -10°C zeigt der Chromophor ein breites $\bar{\nu}(t)$ -Maximum bei $t \approx 1.2\text{ ps}$. Die Kurve ähnelt sehr dem simulierten $C_{\text{DNA}}(t)$ (gepunktete Linie, nach Skalierung). Bei 20°C ist der Komplex teilweise dissoziiert.

Oligomer beobachten wir scharfe spektrale Änderungen bei 23°C sowohl für die Liganden-Absorption (Abbildung S12, S13) als auch für DNA-Hyperchromie. Ein geordneter DNA:H33258-Komplex existiert demnach unterhalb dieser Temperatur. Die spektrale Relaxation bei -10°C (schwarze Linie in Abbildung 5) hat ein breites lokales Maximum um 1 ps , beinahe identisch mit dem simulierten $C_{\text{DNA}}(t)$ (gepunktete Kurve, skaliert von Abbildung S7). Die Signifikanz der Oszillation wird deutlich im Vergleich mit der Kurve für 20°C . (In diesem Fall ist nicht nur die Reibung größer, wie zuvor, sondern der Komplex ist auch teilweise zerfallen.)

Zusammengefasst gibt es zwei Interpretationen für die Frequenzmodulation um 58 cm^{-1} : 1) Wasser ist direkt beteiligt, als kollektive kohärente Bewegung, welche den Liganden beeinflusst; 2) Wasser wirkt mittelbar, indem es eine strukturelle Veränderung – entlang der Erkennungsmode – im elektronisch angeregten Zustand reduziert. Simulationen mit gemischter Quanten-/Molekülmechanik könnten entscheiden, welcher Mechanismus zutrifft. Auch sollte die Breite der kleinen Furche mit der Solvationsenergie des Liganden korreliert werden. Die wichtigste Beobachtung ist eine Frequenzmodulation der Fluoreszenzbande um 29 cm^{-1} (1.1 ps). Mithilfe von MD-Simulationen wird sie einer kohärenten Oszillation des Substrat-Ligand-Abstands und der Breite der kleinen Furche zugeordnet. Der molekulare Mechanismus der Ligandenbindung konnte so direkt beobachtet werden. Es besteht Aussicht auf ultraempfindliche Messungen dieser Art.^[8,9]

Eingegangen am 28. April 2011,
veränderte Fassung am 24. Juni 2011
Online veröffentlicht am 30. August 2011

Stichwörter: Biomolekulare Erkennung · Femtosekundenspektroskopie · Fluoreszenz · Stokes-Verschiebung

- [1] M. C. Vega, I. G. Saez, J. Aymami, R. Eritja, G. A. Vandermarel, J. H. Vanboom, A. Rich, M. Coll, *Eur. J. Biochem.* **1994**, 222, 721.
- [2] C. E. Bostock-Smith, S. A. Harris, C. A. Laughton, M. S. Searle, *Nucleic Acids Res.* **2001**, 29, 693.
- [3] R. G. Schmock, L. M. Gierasch, *Science* **2009**, 324, 198.

- [4] S. Hammes-Schiffer, S. J. Benkovic, *Annu. Rev. Biochem.* **2006**, 75, 519.
- [5] G. M. Lee, C. S. Craik, *Science* **2009**, 324, 213.
- [6] R. V. Mauldin, M. J. Carroll, A. L. Lee, *Structure* **2009**, 17, 386.
- [7] T. Ambjörnsson, S. K. Banik, O. Krichevsky, R. Metzler, *Biophys. J.* **2007**, 92, 2674.
- [8] P. Fita, Y. Stepanenko, C. Radzewicz, *Appl. Phys. Lett.* **2005**, 86, 021909.
- [9] X.-F. Ha, X.-H. Chen, Y.-X. Weng, J.-Y. Zhang, *J. Opt. Soc. Am. B* **2007**, 24, 1633.
- [10] X.-X. Zhang, C. Würth, L. Zhao, U. Resch-Genger, N. P. Ernsting, M. Sajadi, *Rev. Sci. Instrum.* **2011**, 82, 063108.
- [11] J. L. N. Lustres, S. A. Kovalenko, M. Mosquera, T. Senyushkina, W. Flasche, N. P. Ernsting, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 5779; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 5635.
- [12] P. Abbyad, X. H. Shi, W. Childs, T. B. McAnaney, B. E. Cohen, S. G. Boxer, *J. Phys. Chem. B* **2007**, 111, 8269.
- [13] D. Andreatta, J. L. P. Lustres, S. A. Kovalenko, N. P. Ernsting, C. J. Murphy, R. S. Coleman, M. A. Berg, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 7270.
- [14] E. B. Brauns, M. L. Madaras, R. S. Coleman, C. J. Murphy, M. A. Berg, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 11644.
- [15] E. B. Brauns, M. L. Madaras, R. S. Coleman, C. J. Murphy, M. A. Berg, *Phys. Rev. Lett.* **2002**, 88, 158101.
- [16] P. Changelnet-Barret, C. T. Choma, E. F. Gooding, W. F. DeG-rado, R. M. Hochstrasser, *J. Phys. Chem. B* **2000**, 104, 9322.
- [17] X. J. Jordanides, M. J. Lang, X. Y. Song, G. R. Fleming, *J. Phys. Chem. B* **1999**, 103, 7995.
- [18] T. P. Li, A. A. P. Hassanali, Y. T. Kao, D. P. Zhong, S. J. Singer, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 3376.
- [19] S. K. Pal, J. Peon, A. H. Zewail, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 1763.
- [20] S. K. Pal, L. A. Zhao, A. H. Zewail, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 8113.
- [21] L. Y. Zhang, Y. T. Kao, W. H. Qiu, L. J. Wang, D. P. Zhong, *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110, 18097.
- [22] B. Halle, L. Nilsson, *J. Phys. Chem. B* **2009**, 113, 8210.
- [23] L. Nilsson, B. Halle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 13867.
- [24] S. K. Pal, A. H. Zewail, *Chem. Rev.* **2004**, 104, 2099.
- [25] D. Zhong, S. K. Pal, A. H. Zewail, *Chem. Phys. Lett.* **2011**, 503, 1.
- [26] A. Dallmann, M. Pfafe, C. Mücke, R. Mahrwald, S. A. Kovalenko, N. P. Ernsting, *J. Phys. Chem. B* **2009**, 113, 15619.
- [27] K. E. Furse, S. A. Corcelli, *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, 1, 1813.
- [28] K. E. Furse, S. A. Corcelli, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 13103.
- [29] K. E. Furse, S. A. Corcelli, *J. Chem. Theory Comput.* **2009**, 5, 1959.
- [30] G. Cosa, K.-S. Focsaneanu, J. R. N. McLean, J. P. McNamee, J. C. Scaiano, *Photochem. Photobiol.* **2001**, 73, 585.
- [31] A. L. Dobryakov, S. A. Kovalenko, A. Weigel, J. L. Pérez-Lustres, J. Lange, A. Müller, N. P. Ernsting, *Rev. Sci. Instrum.* **2010**, 81, 113106.
- [32] G. Bonner, A. M. Klivanov, *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, 68, 339.