

Aufspaltung des Wellenpakets und Doppelpfad-Desaktivierung im photoangeregten Sehpigment Isorhodopsin**

Dario Polli, Oliver Weingart, Daniele Brida, Emiliano Poli, Margherita Maiuri, Katelyn M. Spillane, Andrea Bottoni, Philipp Kukura, Richard A. Mathies, Giulio Cerullo* und Marco Garavelli*

Abstract: Isorhodopsin ist ein dem Rhodopsin analoges Sehpigment. Es hat die gleiche Opsin-Umgebung, bindet aber statt 11-*cis*-Retinal die 9-*cis*-Form. Dessen Photoisomerisierung ist etwa dreimal langsamer und viel weniger effizient. Das dafür zugrundeliegende mechanistische Prinzip wird hier mit einer Kombination aus quantenmechanischen/molekülmechanischen Simulationen und ultraschneller optischer Spektroskopie mit Sub-20-fs-Auflösung und einem Spektralbereich bis ins nahe Infrarot aufgedeckt. Während sich das photoangeregte Wellenpaket im Rhodopsin zielgerichtet durch eine einzelne konische Durchschneidung zwischen dem angeregten und dem Grundzustand bewegt, spaltet es im Isorhodopsin auf und beschreitet zwei konkurrierende Desaktivierungspfade mit unterschiedlichen Reaktionstrichtern. Einer wird schnell erreicht, ist aber im Wesentlichen unproduktiv. Der andere Pfad ist aufgrund erhöhter sterischer Wechselwirkungen mit der Umgebung verlangsamt, führt aber entlang einer „Vorwärts“-Pedalbewegung zum Photoprodukt.

Der Chromophor des Sehpigments Rhodopsin (Rh)^[1,2] ist die protonierte Schiff-Base des 11-*cis*-Retinals (PSB11). Die Signaltransduktion in Rh wird durch die ultraschnelle (200 fs)^[3–7] und hocheffiziente (0.65 Quantenausbeute, QA)^[8] lichtinduzierte *cis-trans*-Isomerisierung von PSB11^[9,10] ausgelöst, bei der das primäre Photoprodukt Photorhodopsin (photoRh) entsteht. Dieser Prozess kann auch als „ballistische“^[+] Bewegung des photoangeregten

Wellenpaketes aus der Franck-Condon(FC)-Region über eine konische Durchschneidung („conical intersection“, CI) zwischen Grund- und angeregtem Zustand verstanden werden. Die Geschwindigkeit und Effizienz der Photoisomerisierung im Sehpigment hängt dabei von zwei wesentlichen Faktoren ab: 1) von der Protein-Umgebung; in Lösung ist die QA der Photoisomerisierung geringer, und die Reaktion ist um beinahe zwei Größenordnungen langsamer;^[11] und 2) von der spezifischen Konfiguration des Chromophors in der Protein-Bindungstasche: Im Isorhodopsin (isoRh) ist 9-*cis*-Retinal (PSB9) in der gleichen Proteinumgebung eingebettet. Die entsprechende 9-*cis*→all-*trans*-Photoisomerisierung ist allerdings etwa um den Faktor drei langsamer (600 fs),^[12] und das Protein ist deutlich weniger effizient beim Auslösen der Sehkaskade (0.22 QY).^[13] Wie zuerst von Yoshizawa und Wald^[9] berichtet, führt die Photoisomerisierung von isoRh zur Entstehung des gleichen Bathorhodopsin-Photointermediats (bathoRh) wie im Rh. Tatsächlich besteht nach Anregung ein photostationäres Drei-Komponenten-Gleichgewicht zwischen Rh, bathoRh und isoRh.^[10,14] Die längere Isomerisierungsdauer und die geringere Quantenausbeute im isoRh wurden auf eine verminderte Geschwindigkeit des Wellenpaketes entlang der Torsionskoordinate während der Isomerisierung zurückgeführt.^[12]

Hier verwenden wir einen kombinierten experimentellen und computergestützten Ansatz, um den Mechanismus für die weniger effiziente PSB9-Photoisomerisierung und die

[*] Dr. D. Polli, Dr. D. Brida, M. Maiuri, Prof. G. Cerullo
IFN-CNR, Dipartimento di Fisica, Politecnico di Milano
Piazza L. da Vinci, 32, 20133 Milano (Italien)
E-Mail: giulio.cerullo@fisi.polimi.it
E. Poli, Prof. A. Bottoni, Dr. M. Garavelli
Dipartimento di Chimica „G. Ciamician“ Università di Bologna
Via F. Selmi 2, 40126 Bologna (Italien)
E-Mail: marco.garavelli@unibo.it
Dr. O. Weingart
Institut für Theoretische Chemie und Computerchemie
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Universitätsstraße 1, 40225 Düsseldorf (Deutschland)
Dr. K. M. Spillane, Dr. P. Kukura
Department of Chemistry, University of Oxford
Oxford OX1 3QZ (Großbritannien)
Prof. R. A. Mathies
Chemistry Department, University of California at Berkeley
Berkeley, CA 94720 (USA)

+ „Ballistisch“ meint hier eine schnelle, auf ein einzelnes Ziel gerichtete Bewegung.

Dr. D. Polli
Center for Nano Science and Technology @Polimi
Italian Institute of Technology
Via G. Pascoli 70/3, 20133 Milano (Italien)
Dr. M. Garavelli
Laboratoire de Chimie, LR6, Ecole Normale Supérieure de Lyon
46, Allée d'Italie, 69364 Lyon, cedex 07 (Frankreich)
Dr. D. Brida
Fachbereich Physik, Universität Konstanz
78457 Konstanz (Deutschland)
E. Poli
Department of Chemistry, University of Liverpool
Oxford Street, Liverpool L69 3BX (Großbritannien)

[**] G.C. und M.G. danken dem Europäischen Forschungsrat für Unterstützung (Advanced Grant STRATUS; ERC-2011-AdG No. 291198). P.K. bedankt sich für Unterstützung durch die Europäische Gemeinschaft (FP-7 INFRASTRUCTURES-2008-1, „Laserlab Europe II“, Vertrag No. 228334).

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201309867> zu finden.

verlangsamte Bildung von photoRh aufzuklären. Dazu nutzen wir ultraschnelle optische Spektroskopie mit einem Spektralbereich bis ins nahe Infrarot (NIR) und einer Zeitauflösung von weniger als 20 fs. Die Bewegung des Wellenpaketes nach der Photoanregung lässt sich von der FC-Region bis hin zum Photoprodukt verfolgen, indem wir die stimulierte Emission (SE) des Reaktanten während seiner Dynamik im angeregten Zustand messen. Das mechanistische Szenario, das aus den durchgeführten quantenmechanischen/molekülmechanischen(QM/MM)-Dynamikberechnungen resultiert, gibt gemessene Eigenschaften, wie etwa das zeitliche Abklingen der SE, sehr genau wider. Es steht jedoch im Widerspruch zu der gegenwärtigen Ansicht, die einen einzigen, verlangsamten Reaktionspfad bei der Photochemie des isoRh vorsieht. Tatsächlich beobachten wir, dass der Reaktionspfad schnell in zwei konkurrierende Pfade verzweigt, die einer vorwärts und rückwärts gerichteten Pedalbewegung („bicycle pedal motion“) entlang den Doppelbindungen C9=C10 und C11=C12 entsprechen. Diese Pfade führen zu zwei unterschiedlichen konischen Durchschneidungen: Die eine wird schnell erreicht, führt allerdings nicht zum Photoprodukt; die andere wird deutlich später erreicht und führt nach Abregung zum bathoRh. Diese Aufspaltung des Wellenpakets und die unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeiten sind für die geringere QA und die langsamere Isomerisierung, die in isoRh gegenüber Rh beobachtet wird, verantwortlich. Die spektroskopischen Signaturen der beiden individuellen Pfade addieren sich zum Gesamtspektrum und erklären den beobachteten nichtexponentiellen Zerfall des SE-Signals.

Die isoRh-Messprobe wird durch Belichtung von Rh erhalten, welches durch Isolierung aus den Stäbchenzellen der äußeren Netzhautsegmente von Rinderaugen gewonnen wird.^[15] Die Belichtung erfolgt 30 Minuten lang mit Laserlicht von 568 nm bei 77 K. Die Photoisomerisierung lösen wir mit einem 10-fs-Anregungspuls aus. Dieser ist zentriert bei 500 nm und steht in Resonanz mit der Grundzustandsabsorption des isoRh. Das differentielle Transmissionssignal ($\Delta T/T$) messen wir mit Sub-10-fs-Pulsen im sichtbaren Bereich (500–680 nm) und mit 13-fs-NIR-Pulsen (840–1020 nm). Der genaue experimentelle Aufbau ist in den Hintergrundinformationen und in Lit. [16] beschrieben. Die Zeitauflösung war über den gesamten Spektralbereich stets < 20 fs. Die Probe wurde im Durchfluss vermessen, um bei jedem Laserbeschuss die vollständige Ersetzung des fokalen Volumens zu gewährleisten.

Unsere erhaltenen $\Delta T/T$ -Daten für den sichtbaren Bereich (siehe die Hintergrundinformationen) sind in sehr guter Übereinstimmung mit den Messungen von Schoenlein et al.^[12] Die Anreicherung des photoRh-Produkts lässt sich durch eine, gegenüber dem Grundzustand des Reaktanten rotverschobene, photoinduzierte Absorption (PA) erkennen.^[17] Im sichtbaren Bereich ergibt sich das Gesamtsignal aus verschiedenen, miteinander überlappenden Einzelkomponenten:^[12] einem anfänglichen PA-Signal aus dem angeregten Zustand des PSB9-Reaktanten, welches nach dem Anregungspuls anwächst; einem darauffolgenden PA-Signal des stark schwingungsangeregten Grundzustands des nicht isomerisierten Reaktanten (mit einem Anteil von etwa 80 %), und schließlich dem PA-Signal des isomerisierten all-*trans*-

Photoprodukts. Die starke Überlappung der Komponenten erschwert eine direkte Interpretation und Übertragung der Messdaten auf die Dynamik des isoRh. Andererseits lässt sich der angeregte Zustand des Reaktanten mit neuartigen Messverfahren im NIR-Bereich direkt über sein SE-Signal erfassen, wie auch kürzlich für Rh gezeigt werden konnte.^[18] Abbildung 1a zeigt einen 2D- $\Delta T/T$ -Verlauf im NIR-Bereich als Funktion der Messwellenlänge und der Verzögerung zwischen Anregungs- und Mess-Puls. Das Signal zeigt einen schnellen Anstieg der SE bei kurzen Wellenlängen (850 nm),

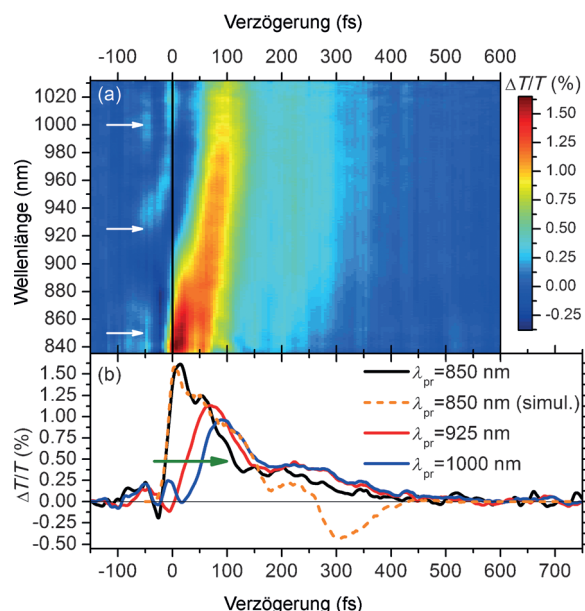


Abbildung 1. a) Verlauf der differentiellen Transmission ($\Delta T/T$) von isoRh im NIR-Bereich nach Anregung mit einem 10-fs-Puls bei 500 nm; b) durchgezogene Linien: zeitlicher Verlauf bei ausgewählten Messwellenlängen; gestrichelte Linien: MD-simuliertes Signal bei 850 nm. Der grüne Pfeil kennzeichnet die verzögerte Ausbildung der SE bei längeren Wellenlängen.

welcher sich rasch nach längeren Wellenlängen hin verschiebt, weil sich die Energielücke zwischen Grund- und angeregtem Zustand verkleinert, wenn sich das Wellenpaket auf die konische Durchschneidung zubewegt.^[18] Das SE-Signal zerfällt nichtexponentiell mit einer anfänglichen schnellen Komponente, die bereits innerhalb von ca. 150 fs abklingt, gefolgt von einem flacheren Plateau, das bis etwa 400 fs nach dem Anregungspuls existiert (Abbildung 1b). Dieser Zweikomponenten-Zerfall des SE-Signals unterscheidet sich deutlich von der beobachteten Zerfallsdynamik des Rh.^[18] Er lässt sich nicht mit dem Bild eines einzelnen Wellenpakets, das sich „ballistisch“ durch eine konische Durchschneidung bewegt, in Einklang bringen.

Um ein dynamisches Modell der photoinduzierten Reaktion zu erhalten, haben wir die Reaktion des Opsin-gebundenen PSB9-Chromophors vom angeregten zum Grundzustand mit einer statistisch relevanten Zahl an QM/MM-Hybridtrajektorien mithilfe des Computerprogramms COBRAMM^[19] simuliert. Ähnliche Methoden wurden bereits verwendet, um die Photodynamik von Rh^[18–21] und anderen

biologisch relevanten Molekülen zu studieren.^[22–25] Das benutzte QM/MM-Verfahren kombiniert die CASSCF(10/10)/6-31G*-ab-initio-Methode (CASSCF: „Complete Active Space—Self-Consistent Field“) mit dem Amber99ff-Kraftfeld durch elektrostatische und molekülmechanische Einbettung der Wellenfunktion.^[23] Mit dieser Kombination konnten wir bereits erfolgreich quantitative Studien an Retinalproteinen durchführen^[18,24] (siehe auch die Hintergrundinformationen). Die transienten Signale werden mittels skaliertener CASSCF-Übergangsenergien simuliert.^[18] Damit wird die Genauigkeit nichtadiabatischer, störungskorrigierter „Complete-Active-Space“-Dynamik (CASPT2)^[25] angenähert, die gegenwärtig nur für deutlich kleinere Systeme anwendbar ist.^[26] Alle Atome außer dem Chromophor und einer 5-Å-Region um diesen werden an den Positionen der Kristallstruktur festgehalten. Ein Ensemble aus insgesamt 81 Startbedingungen wurde mithilfe statistischer Stichproben entlang der Schwingungsmoden bei Raumtemperatur generiert („thermal sampling“). Nullpunktkorrekturen wurden dabei mitberücksichtigt, hochfrequente C-H-, N-H- und O-H-Moden wurden jedoch ausgeschlossen. Weitere Details bezüglich der Systemparameter, der Verkleinerung der QM-Region und der Dynamik können den Hintergrundinformationen entnommen werden.

Die berechneten Trajektorien entlang der C9=C10- und C11=C12-Verdrillung in Richtung der verschiedenen Photoprodukte sind in Abbildung 2a zusammengefasst. Der Trajektorienschwarm, der in der FC-Region des angeregten PSB9 entsteht, verzweigt sich nach etwa 30 fs und verteilt sich beinahe gleichmäßig auf zwei konkurrierende, strahlungsfreie Zerfallskanäle, die zu zwei unterschiedlichen konischen Durchschneidungen (hier CI₁(++) und CI₂(--) genannt) führen. Diese werden über Pedalbewegungen entlang der zwei Doppelbindungen in Rückwärts- und Vorwärtsrichtung erreicht (Abbildung 2a). Die unterschiedlichen sterischen Wechselwirkungen mit der Proteinumgebung führen zu verschiedenen durchschnittlichen CI-Durchgangszeiten: ca. 160 fs für CI₁(++) und ca. 280 fs für CI₂(--) (Abbildung 2b). Das Erreichen der CI(--) im vorwärts gerichteten Pfad wird hauptsächlich durch Wechselwirkungen zwischen H-C11 und TYR268 verzögert. Hier befindet sich ein ausgeprägtes Energieplateau, während die Bewegung des H-C10-C11-H-Fragments im Gegenuhrzeigersinn nahezu ungehindert und somit schneller ablaufen kann (Abbildung 3a). Der Verlauf der Reaktionspfade der beiden Kanäle ist für den experimentell beobachteten, nichtexponentiellen Zweikomponenten-Zerfall des SE-Signals verantwortlich (siehe die simulierte $\Delta T/T$ -Dynamik, gestrichelte Linie in Abbildung 1b). Bemerkenswert ist das schwache PA Signal, das nach etwa 250 fs in der Simulation auftritt, jedoch nicht im Experiment beobachtet wird. Diese Abweichung ist in Einschränkungen der zugrundeliegenden Simulationsmethodik und Statistik begründet, sowie in dem empfindlichen Gleichgewicht zwischen den spektralen Beiträgen der beiden verschiedenen Desaktivierungspfade, aus denen sich das $\Delta T/T$ -Signal im isoRh zusammensetzt.

Qualitativ ähnliche Ergebnisse wurden kürzlich bei Berechnungen von isoRh^[27] mit geringerer Genauigkeit (CAS-(6,6)/6-31G) und unter Vernachlässigung von elektrostati-

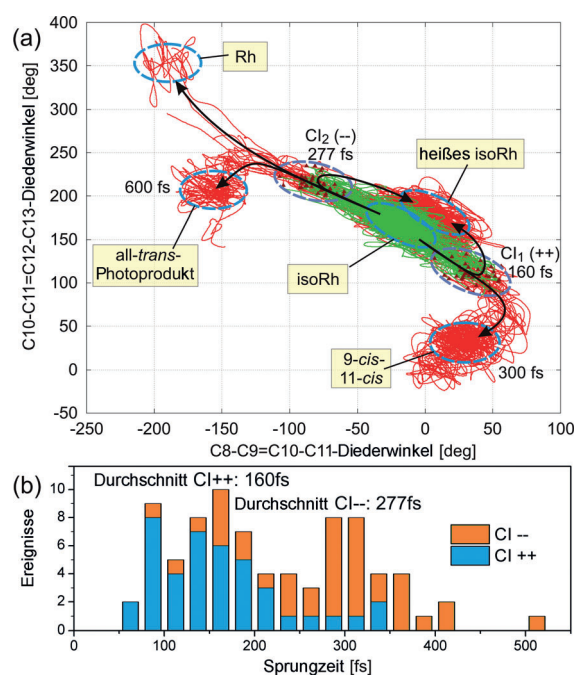


Abbildung 2. a) Überlagerung von 81 berechneten isoRh-Trajektorien von der FC-Region zu den verschiedenen Photoprodukten als Funktion der C₉=C₁₀- und C₁₁=C₁₂-Torsion mit mittleren Reaktionszeiten und Endkonfigurationen. Die Pfade wechseln von grün nach rot beim Wechsel vom angeregten zum Grundzustand an einem der beiden CI-Punkte. b) Verteilung der S₁-Lebensdauern mit Kennzeichnung der Kanäle und Durchschnittsübergangszeiten.

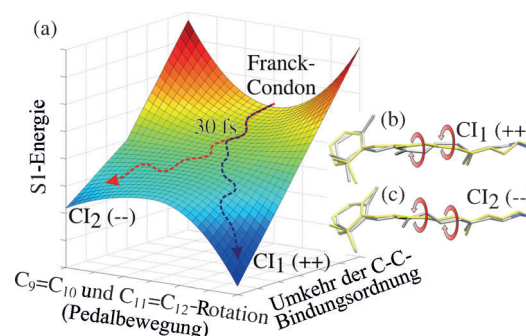


Abbildung 3. a) Modell der isoRh-S₁-Potentialfläche entlang der Pedal- und Bindungsinversionskoordinaten. b, c) Gemittelte Strukturen des Chromophors an den CI₁- und CI₂-Punkten (grau) im Vergleich zur FC-Struktur (gelb). Die roten Pfeile kennzeichnen jeweils Rückwärts/Vorwärts-Pedalbewegungen.

schen Polarisierungseffekten der Wellenfunktion erzielt. Diese Effekte sind jedoch unerlässlich bei der Beschreibung der Umgebungseinflüsse auf den photochemisch relevanten Ladungstransfer im S₁-Zustand und für die Berechnung von experimentell vergleichbaren transienten Spektren und Energien. Allerdings zeigt das Vorhandensein beider Desaktivierungskanäle bei Berechnungen mit mechanischer Einbettung, dass die Aufspaltung des Wellenpakets und die Besetzung der beiden konkurrierenden Pfade hauptsächlich sterische Ursachen haben.

Die Desaktivierungspfade können weiter durch die Richtung der Pedalbewegung charakterisiert werden. Bewegung hin zu $CI_1(++)$ bedeutet positive Verdrillung entlang $C9=C10$, kombiniert mit stark negativer Verdrillung von $C11=C12$ (Abbildung 3b). Diese „rückwärtige“ Pedalbewegung im angeregten Zustand ist ebenfalls verantwortlich für die schnelle Bildung von photoRh^[18,28] im Rh. isoRh-Moleküle, die in unseren Berechnungen dem $CI_1(++)$ -Pfad folgen, reagieren entweder zurück zum Grundzustand des Ausgangsmaterials oder folgen einer starken Verdrillung entlang der $C_{11}=C_{12}$ Torsion zum di-*cis*-Photoprodukt (9,11-di-*cis*, Abbildung 2a). In beiden Fällen wird die Photoisomerisierung entlang der $C9=C10$ -Koordinate abgebrochen. Das all-*trans*-Photoprodukt wird nur über den langsameren $CI_2(--)$ -Kanal mit vorwärts-Pedalbewegung gebildet, d.h. stark negative Rotation um $C9=C10$ und positive Torsion um $C11=C12$ (Abbildung 3c). Die berechnete QA beträgt 16% ($\pm 4\%$; siehe die Hintergrundinformationen). Dieser Wert ist in guter Übereinstimmung mit dem experimentellen Wert (22%) und der verlangsamten Bildung des all-*trans*-Photoprodukts innerhalb von 600 fs in isoRh im Vergleich zu Rh.^[12] Zusätzlich konnten wir in drei Trajektorien eine vollständige Pedalrotation zu einem Rh-ähnlichen Photoprodukt (9-*trans*-11-*cis*, Abbildung 2a) beobachten.

Der Doppelpfad-Desaktivierungsmechanismus konnte auch in Simulationen ohne Startgeschwindigkeiten sowie genaueren und aufwendigeren „full active space“-CAS(12,12)/MM-Berechnungen mit einer geringeren Anzahl von Trajektorien (siehe die Hintergrundinformationen) bestätigt werden. Im erstgenannten folgen die Trajektorien viel enger der Struktur der Potentialfläche, d.h. es ergeben sich geringere, thermische Fluktuationen. Diese Simulation zeigt sogar eine bessere Übereinstimmung mit dem experimentellen Spektrum und der QA ($19 \pm 4\%$, siehe die Hintergrundinformationen). Die aufwendigen CAS(12,12)-Berechnungen lassen jedoch keine statistischen und spektroskopischen Berechnungen zu. Sie deuten aber auf eine geringere QA ($< 5\%$) des 9,11-di-*cis*-Photoprodukts hin. Dies könnte erklären, warum es experimentell bisher keine Hinweise auf dieses Produkt gegeben hat.

Obwohl isoRh und Rh die gleiche Apoproteinumgebung besitzen, finden sich auffällige Unterschiede in ihrer Photochemie. Diese sind vor allem in der verschiedenen Konfiguration der Retinalchromophore und deren sterischen Wechselwirkungen begründet. Trotzdem wird die Photoreaktion in beiden Proteinen über eine einzige Reaktionskoordinate gesteuert. Diese entspricht einer Pedalbewegung entlang der Doppelbindungen $C9=C10$ und $C11=C12$. In der Proteintasche kann 9-*cis*-Retinal „Vorwärts“- und „Rückwärts“-Pedalbewegungen ausführen, während der „Vorwärts“-Pfad für 11-*cis*-Retinal blockiert ist. In beiden Verbindungen entspricht der schnelle Desaktivierungskanal einer „Rückwärts“-Pedalbewegung. Im isoRh ist dieser Desaktivierungspfad nicht produktiv; die Reaktion in Richtung des photoRh verläuft nur in „Vorwärts“-Richtung; dies ist verbunden mit erhöhten sterischen Wechselwirkungen mit dem Protein, welche die Reaktion signifikant verlangsamen (Abbildung 3). Diese Ergebnisse entsprechen denen von Strambi et al.^[29] und verdeutlichen, dass sich Rh und isoRh einen gemeinsamen

Bereich auf der Fläche des angeregten Zustands teilen, die Startpunkte der Reaktionen liegen jedoch an jeweils gegenüberliegenden Seiten (Abbildung 2a). Die Aufspaltung im angeregten Zustand in einen langsamen, produktiven sowie einen schnellen, unproduktiven Kanal erklärt die verminderte Aktivität und QA von isoRh gegenüber Rh. Im letzteren wird nur der schnelle und produktbildende Kanal besetzt und gleichzeitig eine höhere QA erzielt. Demnach erfolgt die Photoisomerisierung im isoRh über einen Zweikanal-Desaktivierungsmechanismus, während die Torsionsrichtung in Rh eindeutig bestimmt ist. Diese Ergebnisse machen isoRh zu einem idealen Kandidaten für Experimente mit kontrollierter Kohärenz,^[30] da die Unterdrückung eines der beiden Reaktionskanäle zu einer deutlich veränderten Photophysik und Photochemie gegenüber dem unveränderten System führen sollte.

Eingegangen am 13. November 2013

Online veröffentlicht am 31. Januar 2014

Stichwörter: Isomerisierungen · Isorhodopsin · Konische Durchschneidungen · Photochemie · Zeitauflösende Spektroskopie

- [1] H. Kandori, Y. Shichida, T. Yoshizawa, *Biochemistry* **2001**, *66*, 1197–1209.
- [2] R. A. Mathies, J. Lugtenburg in *Handbook of Biological Physics*, Band 3 (Hrsg.: D. G. Stavenga, W. J. DeGrip, E. N. Pugh), Elsevier Science, Amsterdam, **2000**, S. 55–90.
- [3] R. W. Schoenlein, L. A. Peteanu, R. A. Mathies, C. V. Shank, *Science* **1991**, *254*, 412–415.
- [4] G. Haran, E. A. Morlino, J. Matthes, R. H. Callender, R. M. Hochstrasser, *J. Phys. Chem. A* **1999**, *103*, 2202–2207.
- [5] H. Chosrowjan, N. Mataga, Y. Shibata, S. Tachibana, H. Kandori, Y. Shichida, T. Okada, T. Kouyama, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9706–9707.
- [6] H. Kandori, Y. Furutani, S. Nishimura, Y. Shichida, H. Chosrowjan, Y. Shibata, N. Mataga, *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *334*, 271–276.
- [7] G. G. Kochendoerfer, R. A. Mathies, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 14526–14532.
- [8] J. E. Kim, M. J. Tauber, R. A. Mathies, *Biochemistry* **2001**, *40*, 13774–13778.
- [9] T. Yoshizawa, G. Wald, *Nature* **1963**, *197*, 1279–1286.
- [10] G. A. Schick, T. M. Cooper, R. A. Holloway, L. P. Murray, R. R. Birge, *Biochemistry* **1987**, *26*, 2556–2562.
- [11] S. L. Logunov, L. Song, M. A. El Sayed, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 18586–18591.
- [12] R. W. Schoenlein, L. A. Peteanu, Q. Wang, R. A. Mathies, C. V. Shank, *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 12087–12092.
- [13] J. B. Hurley, T. G. Ebrey, B. Honig, M. Ottolenghi, *Nature* **1977**, *270*, 540–542.
- [14] S. J. Hug, J. W. Lewis, D. S. Kliger, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 1998–1999.
- [15] I. Palings, J. A. Pardoen, E. van den Berg, C. Winkel, J. Lugtenburg, R. A. Mathies, *Biochemistry* **1987**, *26*, 2544.
- [16] C. Manzoni, D. Polli, G. Cerullo, *Rev. Sci. Instrum.* **2006**, *77*, 023103.
- [17] S. Hahn, G. Stock, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 1146–1149.
- [18] D. Polli, P. Altoe, O. Weingart, K. M. Spillane, C. Manzoni, D. Brida, G. Tomasello, G. Orlandi, P. Kukura, R. A. Mathies, M. Garavelli, G. Cerullo, *Nature* **2010**, *467*, 440–443.

- [19] P. Altoè, M. Stenta, A. Bottoni, M. Garavelli, *Theor. Chem. Acc.* **2007**, *118*, 219–240.
- [20] L. M. Frutos, T. Andruniow, F. Santoro, N. Ferre, M. Olivucci, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 7764–7769.
- [21] S. Hayashi, E. Tajkhorshid, K. Schulten, *Biophys. J.* **2009**, *96*, 403–416.
- [22] G. Groenhof, L. V. Schafer, M. Boggio-Pasqua, M. Goette, H. Grubmüller, M. A. Robb, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6812–6819; H. R. Hudock, B. G. Levine, A. L. Thompson, H. Satzger, D. Townsend, N. Gador, A. Stolow, T. J. Martinez, *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 8500–8508; H. R. Hudock, T. J. Martinez, *Chem-PhysChem* **2008**, *9*, 2486–2490; S. Maeda, K. Morokuma, *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, *7*, 2335–2345.
- [23] M. Wanko, M. Hoffmann, P. Strodel, A. Koslowski, W. Thiel, F. Neese, T. Frauenheim, M. Elstner, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 3606–3615.
- [24] G. Tomasello, G. Olaso-González, P. Altoè, M. Stenta, L. Serrano-Andrés, M. Merchán, G. Orlandi, A. Bottoni, M. Garavelli, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5172–5186.
- [25] K. Andersson, P.-A. Malmqvist, B. Roos, *J. Chem. Phys.* **1992**, *96*, 1218–1226.
- [26] H. Tao, B. G. Levine, T. J. Martinez, *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 13656–13662.
- [27] W. C. Chung, S. Nanbu, T. Ishida, *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 8009–8023.
- [28] A. Warshel, *Nature* **1976**, *260*, 679–683.
- [29] A. Strambi, P. B. Coto, L. M. Frutos, N. Ferré, M. Olivucci, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 3382–3388.
- [30] V. I. Prokhorenko, A. M. Nagy, S. A. Waschuk, L. S. Brown, R. R. Birge, R. J. D. Miller, *Science* **2006**, *313*, 1257–1261.