



# **Struktureigenschaften von Retinal in Channelrhodopsinen**

## **Masterarbeit**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Master of Science - Biochemie

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**B. Sc. Irina Dokukina**

Angefertigt am

**Institut für Theoretische Chemie und  
Computerchemie**

In der Forschungsgruppe von

**Univ.-Prof. Dr. Christel Marian**

Im Oktober 2013

**Referentin:**

Prof. Dr. Christel Marian  
Institut für Theoretische Chemie und  
Computerchemie, Heinrich-Heine-  
Universität Düsseldorf

**Korreferent:**

Prof. Dr. Walter Thiel  
Max-Planck-Institut für Kohlenfor-  
schung

**Wissenschaftliche Betreuung:**

Dr. Oliver Weingart  
Institut für Theoretische Chemie und  
Computerchemie, Heinrich-Heine-  
Universität Düsseldorf

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, die vorliegende Masterarbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt zu haben. Alle Darstellungen, die anderen Schriften wörtlich oder sinngemäß entnommen wurden, sind als solche gekennzeichnet.

---

Irina Dokukina

---

Düsseldorf, den

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Christel Marian nicht nur für eine interessante Themenstellung, sondern auch für weiterführende fachliche Diskussionen, allseitige Unterstützung und einen guten Rat zu jeder Uhrzeit.

Herrn Prof. Dr. Walter Thiel danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Ich danke Dr. Oliver Weingart für die fachliche Kompetenz, Hilfe bei jedem wissenschaftlichen oder technischen Problem, für die investierte Zeit und Geduld. So stellt man sich eine Betreuung vor.

Des Weiteren möchte ich mich bei der gesamten Forschungsgruppe der Theoretischen Chemie bedanken für die herzliche Aufnahme. Eine stets freundliche Atmosphäre und ermunternde Gespräche begleiteten mich in der Zeit, in der diese Masterarbeit entstand.

Herrn Prof. Dr. Lutz Schmitt danke ich für die fachliche Beratung und Hilfsbereitschaft.

Mein herzlicher Dank gilt meiner Familie und meinem Freund, die mir den Rücken freigehalten haben und in schwierigen Situationen ermutigt haben.

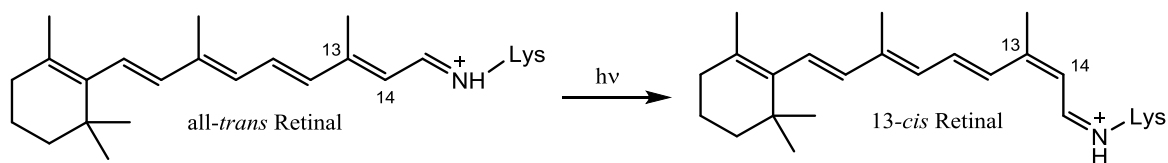
# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Spektroskopische Untersuchungen an Channelrhodopsinen.....	5
1.2	Motivation und Zielsetzung.....	7
2	Theoretischer Teil.....	9
2.1	Photochemie .....	9
2.2	Quantenchemische Grundlagen.....	10
2.2.1	Die stationäre Schrödingergleichung .....	10
2.2.2	Die Born-Oppenheimer-Näherung .....	11
2.2.3	Potentialflächen.....	12
2.2.3.1	Konische Durchdringungen .....	13
2.2.4	Lösen der elektronischen Schrödingergleichung.....	14
2.2.4.1	Die Hartree-Fock Methode .....	14
2.2.4.2	Methode der Konfigurationswechselwirkung .....	17
2.2.4.3	CASSCF .....	18
2.2.4.4	CASPT2.....	19
2.2.4.5	DFT.....	22
2.2.4.6	DFT/MRCI .....	25
2.3	Krauffeldmethoden .....	25
2.4	QM/MM-Methoden .....	27
3	Methodik.....	30
3.1	Erzeugen der Startstrukturen für QM/MM-Berechnungen .....	30
3.1.1	Erstellung von Topologie- und Parameter-Dateien .....	30
3.1.2	Modifikationen und Näherungen .....	30
3.1.3	Erzeugen neuer Bibliotheken für Nicht-Standard-Reste.....	32
3.1.4	Verwendete Modelle .....	33
3.2	QM/MM-Geometrieoptimierungen .....	35
3.3	Berechnung der Anregungsenergien.....	36
3.4	Moleküldynamik (MD)-Simulationen.....	36
4	Ergebnisse .....	37
4.1	QM/MM-Geometrieoptimierung im Grundzustand und Charakterisierung der Zustände .....	37
4.1.1	QM/MM-Geometrieoptimierung-Standard-Protonierung .....	37

4.1.2	Charakterisierung der Zustände von <i>all-trans</i> -Retinal in der ChR-Standard-Protonierung .....	43
4.1.2.1	CASPT2 und DFT/MRCI nach HF-Geometrieoptimierung.....	43
4.1.2.2	CASPT2 und DFT-MRCI nach DFT/B3LYP-Geometrieoptimierung	49
4.1.2.3	CASPT2 und DFT-MRCI nach CASSCF-Geometrieoptimierung.....	51
4.1.3	Vergleich der Anregungsenergien des $1B_u$ Zustands.....	53
4.1.4	QM/MM-Geometrieoptimierung-GLH162-Struktur.....	55
4.1.5	Charakterisierung der Zustände von <i>all-trans</i> -Retinal in der ChR-GLH162-Struktur .....	60
4.2	Einfluss der Umgebung auf die Absorption des <i>all-trans</i> -Retinals.....	62
4.3	Struktur und Absorption des <i>13-cis</i> -Retinals .....	64
4.4	Stabilität der Proteinstruktur .....	68
5	Diskussion .....	72
6	Zusammenfassung .....	76
7	Summary .....	78
8	Ausblick .....	80
9	Literaturverzeichnis .....	81
Anhang	.....	87
A 1	QM/MM-Geometrieoptimierungen im Grundzustand und Charakterisierung der Zustände-Standard-Protonierung .....	87
A 2	QM/MM-Geometrieoptimierungen im Grundzustand und Charakterisierung der Zustände-GLH162-Struktur.....	101
A 3	Das <i>13-cis</i> -Modell.....	112

## 1 Einleitung

Channelrhodopsine sind lichtgesteuerte Ionenkanäle, die in einzelligen Organismen wie *Chlamydomonas reinhardtii* oder *Haematococcus pluvialis* als sensorische Photorezeptoren die Phototaxis kontrollieren [1], [2]. Channelrhodopsine werden aufgrund ihrer Struktur zu den Retinal-Proteinen gezählt. Sie bestehen aus sieben transmembranen Helizes, die einen Ionenkanal bilden [3], [4]. Der Ionenkanal kann lichtgesteuert geöffnet werden, dies führt zu einer schnellen Polarisierung der Zellmembran und Signaltransduktion [3]. Die zuerst entdeckten Channelrhodopsine ChR1 und ChR2 aus *Chlamydomonas reinhardtii* sind die bekanntesten Vertreter. Sie unterscheiden sich in der Aminosäuresequenz und Reaktionsgeschwindigkeit [3]–[5]. Beide Proteine sind selektiv für  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen [6]. Das lichtabsorbierende Vitamin-A-Derivat Retinal befindet sich in der hydrophoben Region der sieben Helizes. Retinal ist dabei über eine protonierte Schiff-Base-Bindung mit einem konservierten<sup>a</sup> Lysin verbunden [7]. Die Protonierung bewirkt eine Rotverschiebung der Absorption [8]. Die Absorptionswellenlänge hängt entscheidend vom Abstand der umgebenden Gegenionen ab [7], [9], [10]. Der Komplex aus Schiff-Base und Gegenionen bildet zusammen mit einigen polaren Resten an der Polyen-Seitenkette des Retinals die aktive Region [7]. Die Lichtabsorption des Retinals führt zu einer all-*trans*→13-*cis* Isomerisierung des Moleküls (Abbildung 1-1), welche eine Konformationsänderung des Proteins und letztendlich Öffnung des Ionenkanals zur Folge hat [8], [11].

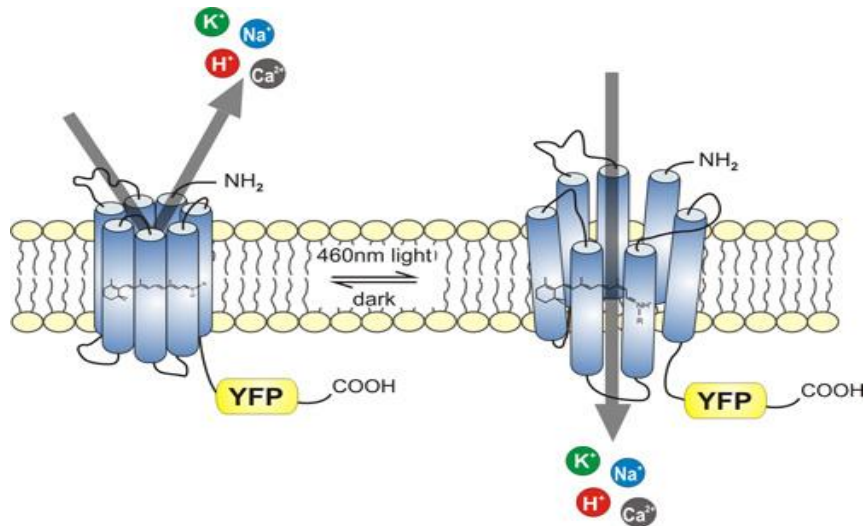


**Abbildung 1-1: Isomerisierung des all-*trans*-Retinals zu 13-*cis* Retinal.**

Im geöffneten Zustand kann ein Ionentransport erfolgen. Bei der Schließung des Ionen-Kanals und der Rückkehr in den Dunkelzustand werden diese strukturellen Änderungen wieder rückgängig gemacht (Abbildung 1-2) [8].

<sup>a</sup> im Laufe der Evolution erhalten geblieben

## 1. Einleitung



**Abbildung 1-2: Lichtaktivierung des ChR2 aus Referenz [12].**

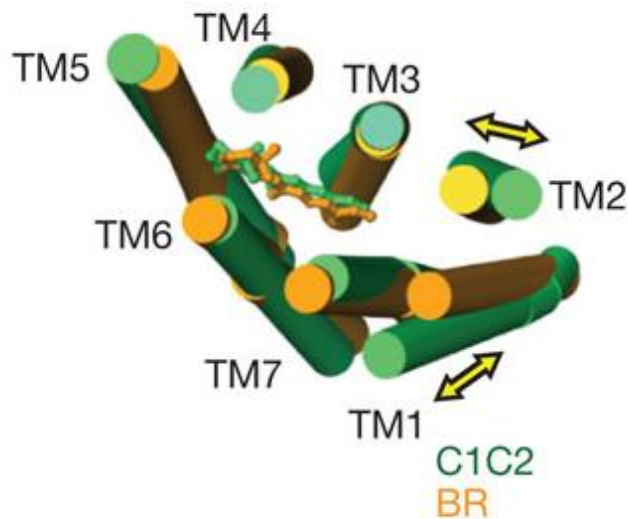
Der intra- und extrazelluläre pH-Wert hat dabei einen erheblichen Einfluss auf die Konformationsänderung während der Reaktion, sowie die Regeneration nach der Depolarisation [3]. Bei der Untersuchung der Öffnung und Regeneration der Proteine fand man heraus, dass zwei Reste (C128, D156) eine zentrale Rolle bei diesem Mechanismus einnehmen. Diese sind über ein komplexes Wasserstoffbrücken-Netzwerk verbunden. Eine Mutation der betroffenen Stellen führte zu einer erheblichen Verlängerung der Lebenszeit des geöffneten Zustands [13].

Mit Hilfe moderner gentechnischer Verfahren können Channelrhodopsine in erregbaren Zellen wie Neuronen exprimiert werden. Von großem Vorteil ist ebenfalls die Tatsache, dass die Vorstufe des Retinals, Vitamin A, natürlicherweise in den meisten Wirbeltierzellen vorkommt. Channelrhodopsine, die in diesen Zellen exprimiert wurden, konnten durch gezielte Belichtung depolarisiert werden. Dadurch entstehen praktische Anwendungen in den Biowissenschaften und vor allem den Neurowissenschaften. Durch kurze Lichtpulse lässt sich die Aktivität von Channelrhodopsin-exprimierenden Zellen ein- und ausschalten. Mit dieser Technik ließen sich bereits genaue Karten von Zellpopulationen in Säugerhirnen anfertigen. Durch Expression von ChR2 in Bipolarzellen der Netzhaut blinder Mäuse konnte die Sehfunktion im Auge teilweise regeneriert werden. Dieser neu entstandene Wissenschaftsbereich wird als Optogenetik bezeichnet und markiert erst den Anfang vieler möglicher Anwendungen [14]–[16].

Die bisher einzige bekannte Kristallstruktur für Channelrhodopsine ist die des C1C2 Chimeraproteins aus *Chlamydomonas reinhardtii*. C1C2 ist ein Fusionsprotein aus Channelrhodopsin1 (ChR1) und Channelrhodopsin2 (ChR2). Es besteht zum größten

## 1. Einleitung

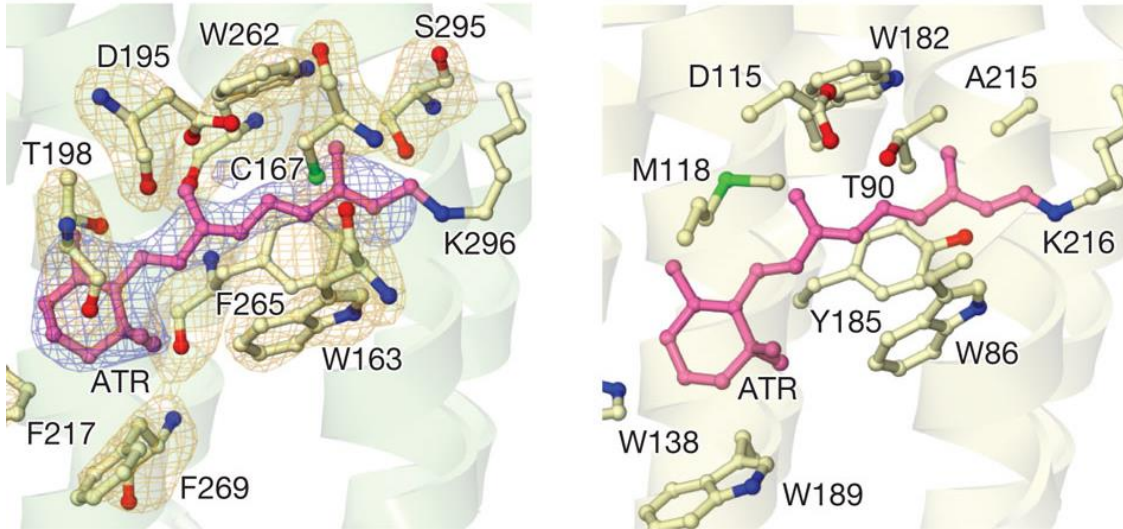
Teil aus ChR1, in dem zwei Transmembranhelizes durch die von ChR2 ersetzt wurden. Das Protein hat sich als funktionsfähig erwiesen und wird deshalb als Modell für die Untersuchung der Eigenschaften von Channelrhodopsinen (ChRs) verwendet. Die C1C2 Struktur ist ein Dimer, das aus zwei Untereinheiten besteht. Die Aminosäuresequenz der Channelrhodopsine ist der von Bakteriorhodopsin (bR) und anderen mikrobiellen Opsinen, wie z.B. Xanthorhodopsin und Sensorischem Rhodopsin II (SRII) sehr ähnlich. Am besten lässt sie sich mit bR vergleichen [7], [17]. Der größte strukturelle Unterschied zwischen C1C2 und bR ist die Position der transmembranen Helizes TM1 und TM2 (Abbildung 1-3).



**Abbildung 1-3: Überlagerung der Transmembranregion von C1C2 (grün) und bR (orange). Pfeile deuten Kippen der Helizes TM1 und TM2 aus Referenz [7].**

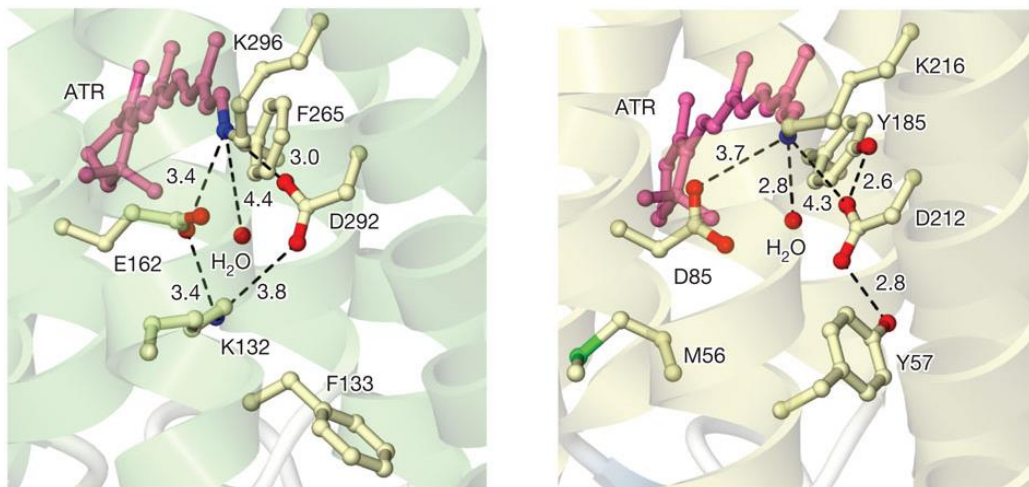
Diese sind in C1C2 gekippt, wodurch sich die Kavität zwischen TM1, 2 und 7 vergrößert und somit einen Wassereinstrom erlaubt. Die Position der protonierten Schiff-Base ist dagegen konserviert. Analog zu bR befinden sich in der Nähe der Polykette und des  $\beta$ -Iononrings fünf aromatische Aminosäurenreste (Trp163, Phe217, Trp262, Phe265 und Phe269), die zu der Hydrophobizität der Retinal-Bindetasche beitragen (Abbildung 1-4). Demgegenüber formen Cys167, Thr198 und Ser295 eine weniger hydrophobe Tasche und sollen zur Absorptionsverschiebung beitragen [7].

## 1. Einleitung



**Abbildung 1-4: Vergleich der Retinal-Bindungstasche von C1C2 (links) und bR (rechts) aus Referenz [7].**

Im bR agiert das Wasser als Protonenakzeptor bei der Deprotonierung der Schiffbase während des Photozyklus und überträgt das Proton auf das Gegenion Asp 85 (Abbildung 1-5, rechts) [18].



**Abbildung 1-5: Umgebung der Retinal-Schiff-Base in C1C2 (links) und bR (rechts) [7].**

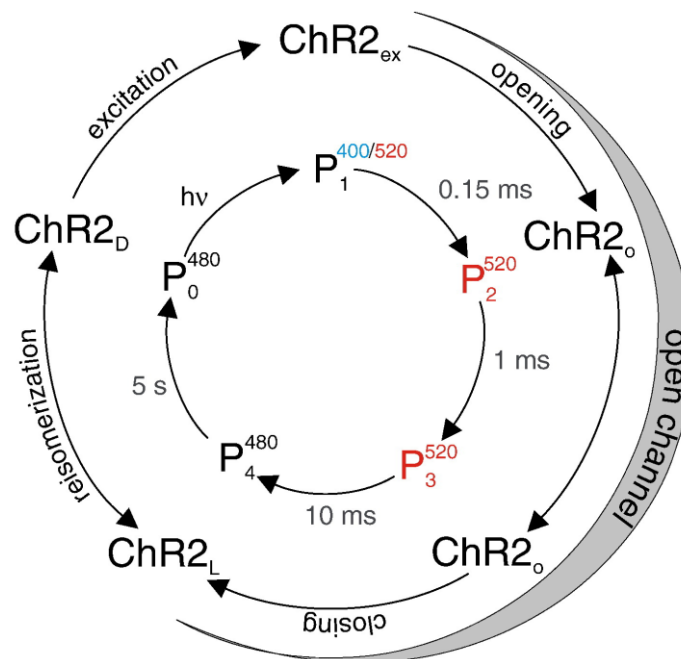
Im C1C2 kann das Wassermolekül aufgrund eines zu großen Abstandes bezüglich der protonierten Schiff-Base nicht als Protonenakzeptor fungieren (Abbildung 1-5, links). Folglich können anstatt des Wassermoleküls Glu162 oder Asp292 bei der Deprotonierung eine Rolle spielen. Mutationsstudien zeigten, dass eher Asp292 als Protonenakzeptor fungiert. Dabei wird postuliert, dass Glu162 auch in protonierter Form vorliegen kann. Die maximale Absorption des C1C2 ( $\lambda_{max} = 470 \text{ nm}$ ) ist gegenüber der von bR ( $\lambda_{max} = 568 \text{ nm}$ ) blauverschoben. Grundsätzlich gilt für Retinal-

## 1. Einleitung

proteine, dass das Maximum der Absorption in etwa der vertikalen Anregungsenergie zwischen  $S_0$ - $S_1$  Zuständen entspricht. Diese wird durch Planarität des konjugierten Systems und die Umgebung der Schiff-Base beeinflusst [10]. Kato *et al.* vermuten, dass die Blauverschiebung auf das ca. 1 Å näher an der Schiff-Base gelegene Asp292 zurückzuführen ist, welches dem Asp85 Gegenion von bR entspricht. Zusätzlich sollen dabei die negativ geladenen Aminosäurenreste entlang des Ionenkanals eine Rolle spielen. Begründet wird dies mit der Stabilisierung des Grundzustands im Vergleich zu  $S_1$  [7].

### 1.1 Spektroskopische Untersuchungen an Channelrhodopsinen

Der Photozyklus der Channelrhodopsine kann am Beispiel des ChR2 diskutiert werden (Abbildung 1-6).



**Abbildung 1-6: Photozyklus von ChR2 und Zusammenhang zwischen kinetischen Intermediaten  $P_0$ - $P_4$ , spektralen Intermediaten  $P^{480}$ ,  $P^{400}$ ,  $P^{520}$  und funktionellen Zuständen des Ionenkanals.  $ChR_D$  und  $ChR_L$  charakterisieren jeweils den lichtadaptierten und dunklen Grundzustand.  $ChR_{2_{ex}}$  entspricht dem angeregten Zustand vor Kanalöffnung ( $ChR_o$ ) aus Referenz [8].**

Im Dunkelzustand  $ChR_D$  ist der Ionenkanal geschlossen. Anregung mit Licht führt innerhalb von ca. 400 fs zur *all-trans*→*13-cis* Isomerisierung des Retinals. Für die *cis-trans* Isomerisierung in Rhodopsin bzw. seinem Analogon Isorhodopsin konnte gezeigt werden, dass diese über eine sogenannte konische Durchdringung (engl. *Conical Intersection, CI*) erfolgt [19]–[21]. Der Grundzustand  $P_0$  absorbiert bei ca. 480 nm. Nach ungefähr 50 ns wird neben umfangreichen Konformationsänderungen

## 1. Einleitung

im Proteinerückgrat ein erster rotverschobener Übergangszustand beobachtet. Diese Zustandsänderung wurde in Zusammenhang mit der Bildung des Ionenkanals gebracht, allerdings ist der Kanal noch nicht durchlässig für Ionen. Die Bildung eines blauverschobenen Intermediats nach weiteren 4  $\mu\text{s}$  deutet auf eine Deprotonierung der Schiff-Base hin. In Folge öffnet sich der Ionenkanal und zwei neue reprotonierte kinetische Intermediate bei 520 nm entstehen (P2 und P3). Die Kanalöffnung wurde durch elektrophysiologische Messungen bestätigt [3]. In den darauffolgenden 10-30 ms schließt sich der Kanal wieder und bildet den Zustand P4. Innerhalb von 5 s regenerieren das Retinal und der Ionenkanal und kehren in den Anfangszustand zurück, von dem aus der Zyklus von neuem beginnen kann. Die Lebenszeit des geöffneten Kanals hängt direkt von der Lebensdauer des 520 nm-Intermediats ab (P1-P3) [8].

Eine eindeutige Zuordnung der Retinal-Konformationen zu den Intermediaten kann nicht mit Sicherheit erfolgen. Es wird nicht ausgeschlossen, dass ein Teil der Intermediate aus der 13-*cis* Konformation resultieren [6], [22]. Das Vorhandensein anderer Intermediate wie 9-*cis* Retinal im Spektrum wird auch in Betracht gezogen [13]. Die alleinige Verwendung von Spektraldaten kann die auftretenden Phänomene nicht zuverlässig erklären. Quantenmechanische Berechnungen, die die erwähnten Strukturen modellieren, könnten dabei einen signifikanten Beitrag leisten.

Erste kombinierte quantenmechanische und molekülmechanische (QM/MM) Studien wurden basierend auf Homologiemodellen von bR von Welke *et al.* durchgeführt. Dabei wurden die maximale Absorptionswellenlänge und die Struktur des Wasserstoffbrückennetzwerks mittels SORCI/SCC-DFTB<sup>b</sup> Methoden mit expliziter Polarisierung untersucht. Das berechnete Wasserstoffbrückennetzwerk war mit dem von bR vergleichbar. Durch die systematische Mutation von Aminosäuren innerhalb der Bindungstasche von bR nach ChR1 wurde versucht, den Mechanismus der Opsin-Verschiebung aufzuklären und spezifische Mutationen zu finden, die eine signifikante Änderung der Absorptionswellenlänge verursachen. Ein signifikanter Einfluss ließ sich für Gegenionen feststellen [9]. Anhand der C1C2 Kristallstruktur haben Kamiya *et al.* [23] mit QM/MM Berechnungen mit auf Dichtefunktionaltheorie (DFT)-basierten B3LYP/CHARMM<sup>c</sup> -Methoden durchgeführt. Nach Substitution und Geometrieopti-

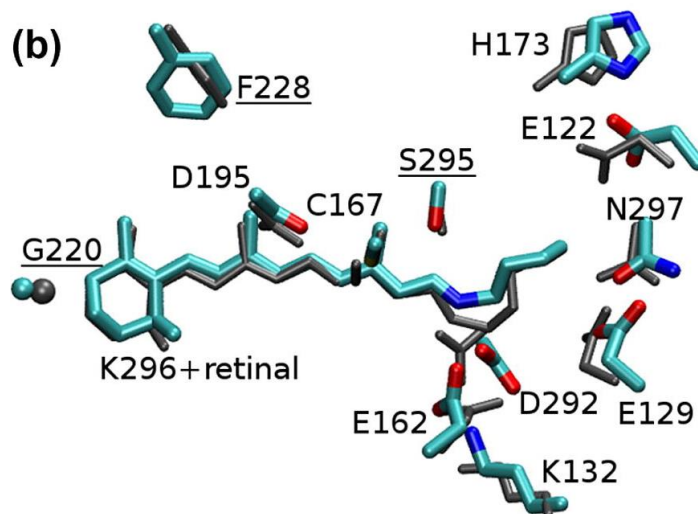
---

<sup>b</sup> engl. *Spectroscopy-Oriented Configuration Interaction/ Self-Consistent Charge-Density Functional Theory Based Tight Binding method*

<sup>c</sup> Becke, drei-Parameter, Lee-Yang-Parr Dichtefunktional, CHARMM-Kraftfelder

## 1. Einleitung

mierungen wies ihre C1C2 Struktur starke Abweichungen zur Kristallstruktur von Kato *et al.* auf (Abbildung 1-7) [7].



**Abbildung 1-7: Struktureller Vergleich der Reste in der Nähe des Chromophors nach einer MD-Simulation aus Referenz [23]**

Dabei waren die Positionen einiger Aminosäuren in der Nähe des Chromophors und besonders die Position des Schiff-Base-Terminus und der geladenen Reste verändert. Diese Geometrieänderungen können die Absorptionswellenlänge und die Zuordnung der Zustände erheblich beeinflussen. Die beschriebenen MRMP2<sup>d</sup>-berechneten Absorptionswellenlängen stimmen zwar gut mit den experimentell ermittelten überein, jedoch wurden Werte für andere angeregte Zustände, ihre Zusammensetzung und die Oszillatorenstärken bisher nicht veröffentlicht und erlauben deshalb keine Charakterisierung der angeregten Zustände.

### 1.2 Motivation und Zielsetzung

Die von Kamiya *et al.* optimierte Geometrie scheint gegenüber der Kristallstruktur stark verändert zu sein. Deshalb sollen QM/MM Geometrieoptimierungen unter Anwendung verschiedener Methoden für den QM-Teil (HF<sup>e</sup>, DFT/B3LYP<sup>f</sup>, CASSCF<sup>g</sup>) durchgeführt werden. Von Kato *et al.* wird die Protonierung des Gegenions Glutamat162 (Glu162) vorgeschlagen (s. Kapitel 1). Anhand einer Modellstruktur mit protoniertem Glu162 soll diese Vermutung näher untersucht werden. Des Weiteren wurde in der Studie von Kamiya *et al.* die Anregungsenergie berechnet, ohne den betreffenden Zustand näher zu charakterisieren. Die Qualität der Berechnungen kann je-

<sup>d</sup> Multireferenz Möller-Plesset Störungstheorie zweiter Ordnung

<sup>e</sup> Hartree-Fock-Methode

<sup>f</sup> Dichtefunktionaltheorie mit Becke, drei-Parameter, Lee-Yang-Parr Dichtefunktional

<sup>g</sup> engl. *Complete Active Space Self Consistent Field*-Methode

## 1. Einleitung

doch ohne die Kenntnis über die Zusammensetzung der Zustände nicht mit Sicherheit beurteilt werden. Im Rahmen dieser Arbeit werden Grundzustands- und Anregungsenergien mehrerer Zustände mittels verschiedener Methoden (CASSCF/CASPT2<sup>h</sup>, DFT/MRCI<sup>i</sup>) berechnet und deren Konfigurationen charakterisiert. Zusätzlich sollte der Einfluss einzelner Aminosäuren auf die Absorption untersucht werden. Ein weiteres Ziel ist es, die Geometrie des 13-*cis*-Retinals zu modellieren und dessen elektronische Struktur zu untersuchen. Moleküldynamik (MD) Simulationen im Vakuum und in Lösung werden durchgeführt, um die Flexibilität des Systems zu beurteilen und um Strukturen für weitere QM/MM-Studien zu erhalten.

---

<sup>h</sup> engl. *Complete Active Space second order Perturbation Theory*

<sup>i</sup> Multireferenz Konfigurationswechselwirkung (engl. *Multi Reference Configuration Interaction*)

## 2 Theoretischer Teil

### 2.1 Photochemie

Unter dem Begriff Photochemie werden chemische Reaktionen oder physikalische Prozesse zusammengefasst, die aus der Wechselwirkung von Materie mit sichtbarem oder ultraviolettem Licht resultieren. Photochemische Reaktionen sind für viele Lebewesen von entscheidender Bedeutung. Diese sind z.B. in Form von *cis-trans* (und *trans-cis*) Isomerisierung in lebenswichtigen Prozessen wie dem Sehprozess oder Phototaxis involviert [24]. Des Weiteren können Erkenntnisse aus der Photochemie zur Verbesserung der Lebensqualität beitragen, indem sie z.B. in der Medizin (photodynamische Therapie, Optogenetik) [5], [25] oder bei der Suche nach alternativen Energiequellen eingesetzt werden [26]. Diese Tatsachen machen die Photochemie zu einem interdisziplinären Forschungsfeld [27].

Beim Auftreffen von Licht geeigneter Frequenz auf ein Molekül im Grundzustand kann es durch Absorption eines Lichtquants in einen elektronisch angeregten Zustand übergehen. Die Desaktivierung des angeregten Zustandes erfolgt entweder photophysikalisch durch Rückkehr in den ursprünglichen Grundzustand oder photochemisch unter Entstehung neuer Verbindungen. Die photophysikalischen Prozesse können in intra- und intermolekulare Vorgänge unterteilt werden. Die intramolekulare photophysikalische Relaxation wird im Jablonski-Diagramm dargestellt (Abbildung 2-1). Durch Absorption gelangen Moleküle aus dem Grundzustand, z.B. Singulettzustand  $S_0$ , in höhere Singulettzustände  $S_n$ . Diese elektronische Anregung geht meistens mit Anregung höherer Schwingungsniveaus  $\nu_n$  einher. Unter Dissipation der überschüssigen Schwingungsenergie erfolgt eine vibronische Relaxation (*VR*) in das niedrigste Schwingungsniveau innerhalb eines elektronischen Zustandes. Von diesem Zustand kann weitere Relaxation strahlungslos über interne Konversion (*Internal Conversion, IC*) zwischen isoenergetischen Schwingungsniveaus oder unter Photonenemission, genannt Fluoreszenz (normalerweise  $S_1 \rightarrow S_0$ ) erfolgen. Durch strahlungslose spinverbotene Übergänge (*Intersystem Crossing, ISC*) werden Triplett-Zustände  $T_n$  bevölkert. Die Desaktivierung der Triplett - Zustände findet entweder strahlungslos über *ISC* oder strahlend durch Phosphoreszenz statt, wobei das System aus dem  $T_1$  in den Singulettgrundzustand  $S_1$  relaxiert [27].

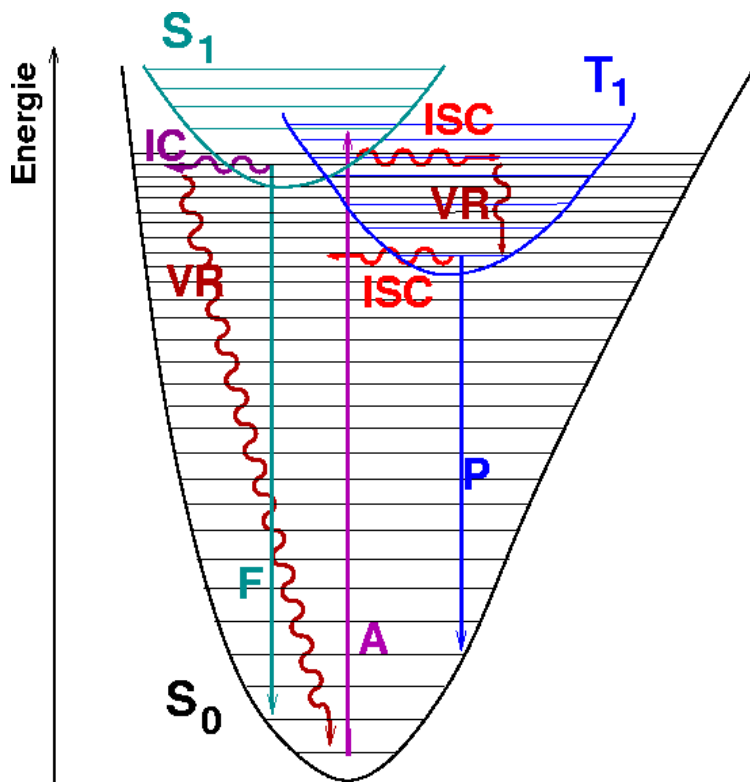


Abbildung 2-1: Jablonski-Diagramm. Schematische Darstellung der Potentialkurven des Grundzustands ( $S_0$ ), des ersten angeregten Singulettzustands ( $S_1$ ) und des ersten angeregten Triplettzustands ( $T_1$ ). A: Absorption, F: Fluoreszenz, P: Phosphoreszenz, VR: Schwingungsrelaxation (Vibrational Relaxation), IC: Interne Umwandlung (Internal Conversion), ISC: Intersystem Crossing aus Referenz [28].

Zu den intermolekularen physikalischen Desaktivierungsprozessen zählen Auslöschung (*quenching*), Bildung von Exzimeren/Exzipleken, Energie- und Elektronentransfer [29].

## 2.2 Quantenchemische Grundlagen

### 2.2.1 Die stationäre Schrödingergleichung

Das Verhalten von Teilchen auf subatomarer Ebene, wie z.B. Elektronen und Kernen, kann mit quantenmechanischen Verfahren erfasst werden. Die Änderung des quantenmechanischen Zustands eines Systems kann durch eine Differentialgleichung, die sog. Schrödingergleichung, beschrieben werden. Sie hängt von den Koordinaten aller Teilchen des Systems und der Zeit ab. Für die meisten Fragestellungen der Quantenchemie reicht die zeitunabhängige Form:

## 2. Theoretischer Teil

$$\mathcal{H}\psi = E\psi \quad (2-1)$$

Gleichung (2-1) stellt ein Eigenwertproblem dar. Dabei ist  $E$  der Eigenwert und entspricht der Gesamtenergie des Systems,  $\psi$  ist die Eigenfunktion und  $\mathcal{H}$  der Hamilton-Operator. Mögliche Lösungen der Schrödingergleichung sind Wellenfunktionen bzw. Zustandsfunktionen  $\psi$ . Experimentelle Observable ist jedoch die Wahrscheinlichkeitsdichte:

$$|\psi|^2 = \psi^*\psi, \quad (2-2)$$

wobei  $\psi^*$  die komplex Konjugierte zu  $\psi$  ist. Die zeitunabhängige Schrödingergleichung bezieht sich auf den stationären Zustand. Stationär bedeutet in diesem Fall, dass die Wahrscheinlichkeitsdichte  $|\psi|^2$  konstant bleibt. Während sich für ein Einelektronensystem wie das H-Atom eine exakte Lösung finden lässt, werden für Mehr Elektronensysteme und Moleküle die Lösungen angenähert [30], [31].

### 2.2.2 Die Born-Oppenheimer-Näherung

Die Schrödingergleichung für Mehrteilchenprobleme wird durch die sogenannte Born-Oppenheimer-Näherung vereinfacht. Diese beruht darauf, dass Kerne viel schwerer sind als Elektronen und sich deswegen viel langsamer bewegen. Näherungsweise lassen sich dadurch Elektronen- und Kernbewegungen separat betrachten. Der elektronische Hamilton-Operator ( $\mathcal{H}_{el}$ ), der die Bewegung von  $N$  Elektronen im Feld von  $M$  Atomkernen beschreibt, ergibt sich zu:

$$\mathcal{H}_{el} = - \sum_{i=1}^N \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}} \quad (2-3)$$

Dabei ist  $\nabla_i^2$  der Laplace - Operator, ein Differentialoperator in Bezug auf das  $i$  - te Elektron,  $Z_A$  die Kernladungszahl,  $r_{iA}$  der Abstand zwischen dem  $i$  - ten Elektron und dem  $A$  - ten Kern,  $r_{ij}$  der Abstand zwischen dem  $i$ -ten Elektron und dem  $j$  - ten Elektron. Die elektronische Schrödingergleichung (2-4)

$$\mathcal{H}_{el}\psi_{el} = E_{el}\psi_{el} \quad (2-4)$$

kann für mehrere Kernanordnungen punktweise gelöst werden. Die Kernkoordinaten gehen in diese Gleichung parametrisch ein, d.h. dass  $\psi_{el}$  sich für jede Kernanord-

## 2. Theoretischer Teil

nung ändert. Unter der Berücksichtigung der Kernabstoßung ergeben sich beim Lösen der elektronischen Schrödinger-Gleichung Potentialenergieflächen (PEF), die die Energie in Abhängigkeit der Kernbewegung beschreiben [30].

### 2.2.3 Potentialflächen

Ein Energieminimum auf der PEF entspricht einer Gleichgewichtsgeometrie des Moleküls und ist somit ein stabiler Zustand des Systems. Dadurch wird die Suche nach Minima auf den PEF zu einer wichtigen Aufgabe bei der Molekülmodellierung. Das Optimierungsproblem kann allgemein als Minimierung der Energie in Abhängigkeit von Kernkoordinaten formuliert werden. Die Energiefunktion kann dabei die Lösung der Schrödingergleichung sein oder sie entstammt einem Kraftfeld [32], [33]. Verfahren zur Geometrieoptimierung, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, beruhen auf der Bestimmung des Gradienten nach der Methode des steilsten Abstiegs (engl. *Steepest Descent*, *SD*) und der Methode der konjugierten Gradienten (engl. *Conjugate Gradient*, *CG*) bzw. auf der Bestimmung des Gradienten und der Hesse-Matrix im Newton-Raphson Verfahren. Die Newton-Raphson Methode stellt dabei die Grundlage für den Beryn-Algorithmus dar, der im Rahmen der QM/MM-Geometrieoptimierung in der vorgelegten Arbeit verwendet wurde. Im Beryn-Algorithmus wird die Hesse-Matrix am Anfang der Optimierung angenähert. Die Näherung erfolgt unter Verwendung einfacher Valenzkraftfelder. Daraufhin werden Energien und die ersten Ableitungen, die während der Optimierung erhalten werden, für die Aktualisierung der Hesse-Matrix verwendet [34].

Da Moleküle bei Normalbedingungen keine starren Strukturen sind, ist die Untersuchung der dynamischen Prozesse wichtig. Dies wird durch Ausführen der Moleküldynamik-Simulationen ermöglicht. In der Moleküldynamik werden Strukturen schrittweise unter Verwendung der Newtonschen Bewegungsgesetze generiert. Als Ergebnis erhält man Trajektorien, die Informationen über Änderung der Positionen und Geschwindigkeiten im System anhängig von der Zeit enthalten. Trajektorien werden durch Lösung von Differentialgleichungen der folgenden Form:

$$\frac{d^2x_i}{dt^2} = \frac{F_{x_i}}{m_i} \quad (2-5)$$

## 2. Theoretischer Teil

erhalten. Diese Gleichung beschreibt die Bewegung eines Teilchens mit der Masse  $m_i$  entlang der Koordinate  $x_i$  unter Einfluss der Kraft  $F_{x_i}$  in diese Richtung. In der vorliegenden Arbeit werden MD-Simulationen zur Äquilibration eingesetzt [33].

### 2.2.3.1 Konische Durchdringungen

Konische Durchdringungen (engl. *Conical Intersection*, *CI*) verbinden die Potentialflächen zweier elektronischer Zustände gleicher Symmetrie. Sie ermöglichen einen strahlungsfreien und schnellen Übergang eines Systems von einem Zustand in einen anderen. Tritt ein Molekül in die Nähe einer konischen Durchdringung, wird es meist entlang des Reaktionstrichters (s. Abbildung 2-2, links) beschleunigt und kann von dort aus, je nach Eingangsrichtung zum entsprechenden Photoprodukt oder zurück zum Ausgangszustand relaxieren. Konische Durchdringungen sind keine stationären Punkte, sondern vielmehr Hyperflächen, bei denen die Energien der betreffenden Zustände in  $n-2$  Dimensionen (dem sog. Durchdringungsraum) entartet sind. Die übrigen 2 Dimensionen bilden den Verzweigungsraum (eng. *branching space*), entlang zweier unabhängiger Koordinaten, die die Entartung aufheben. Diese werden durch den Gradientendifferenzvektor und den nichtadiabatischen Kopplungsvektor beschrieben und bestimmen die Gestalt des Reaktionstrichters (Abbildung 2-2, rechts). Diese kann erheblichen Einfluss auf den Ausgang der Reaktion nehmen. Der Reaktionstrichter kann dabei spitz sein (engl. *peaked CI*) oder verschoben (engl. *sloped* oder *tilted CI*) sein. Das Durchlaufen einer konischen Durchdringung beruht auf innerer Umwandlung (s. Kapitel 2.1).

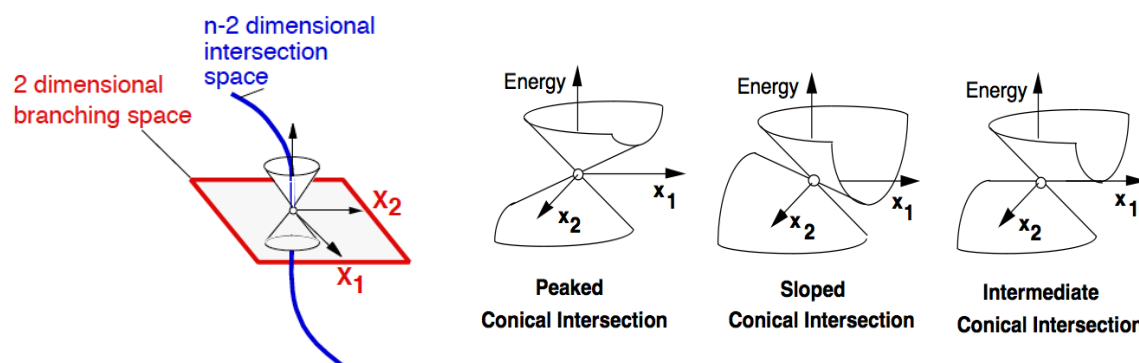


Abbildung 2-2: Konische Durchdringung im  $n$ -dimensionalen Raum (links). Topologien von Reaktionstrichtern konischer Durchdringungen (rechts) aus Referenz [35].

Die Elektronen- und Kernbewegungen sind dabei gekoppelt, wodurch die Born-Oppenheimer Näherung ungültig wird. Die Berechnung von Moleküleigenschaften in der Nähe konischer Durchdringungen erfordert eine Reihe von Korrekturen zur

## 2. Theoretischer Teil

Born-Oppenheimer Näherung. So müssen z.B. die Kopplungsterme zwischen den beteiligten adiabatischen Zustandsflächen ermittelt werden [35], [36].

### 2.2.4 Lösen der elektronischen Schrödingergleichung

Der elektronische Hamilton-Operator in Gleichung (2-3) hängt nur von räumlichen Koordinaten ab. Um die Elektronen komplett zu beschreiben muss eine weitere Eigenschaft des Elektrons miteinbezogen werden-der Spin. Im Rahmen der nicht relativistischen Quantentheorie geschieht das durch Einführen der Spinfunktionen  $\alpha(\omega)$  und  $\beta(\omega)$ , die jeweils entgegengesetzten Spins entsprechen (engl. *spin up* und *spin down*). Die Wellenfunktion hängt somit von den räumlichen Koordinaten  $r$  und von der Spinkoordinate  $\omega$  ab. Werden  $r$  und  $\omega$  als  $x$  zusammengefasst, so lässt sich die Wellenfunktion als  $\Psi(x_1, x_2, \dots, x_n)$  darstellen. Da die Elektronen ununterscheidbar sind, muss die Wellenfunktion antisymmetrisch bezüglich der Vertauschung der  $x$ -Koordinate jeder zwei Elektronen sein:

$$\Psi(x_1, x_2, \dots, x_n) = -\Psi(x_1, x_2, \dots, x_n) \quad (2-6)$$

Das bekannte Pauli-Prinzip ist eine direkte Konsequenz dieses so genannten Antisymmetrieprinzips [30].

Wellenfunktionen, die von Raum- und Spinkoordinaten abhängen, werden als Spinorbitale bezeichnet. Aus jedem Raumorbital können zwei verschiedene Spinorbitale jeweils für den  $\alpha$  und  $\beta$  Spin gebildet werden:

$$\chi(x) = \begin{cases} \psi(r)\alpha(\omega) \\ \text{oder} \\ \psi(r)\beta(\omega) \end{cases} \quad (2-7)$$

Dabei sind sowohl Raum- als auch Spinorbitale orthonormal.

#### 2.2.4.1 Die Hartree-Fock Methode

In Mehrteilchensystemen werden Elektronenbewegungen durch Elektronenabstoßung beeinflusst. Für eine vollständige quantenmechanische Charakterisierung des Systems müssen diese Elektronenwechselwirkungen mitberücksichtigt werden. Bei der Anwendung der Hartree-Fock (HF) Methode wird die Elektronenwechselwirkung durch ein Modell unabhängiger Teilchen angenähert. In diesem Modell wechselwirkt jedes  $i$ -te Elektron mit dem gemittelten Potential aller an-

## 2. Theoretischer Teil

deren Elektronen. Die auf diese Weise ermittelte HF-Energie ist eine obere Grenze für die exakte Energie. Diese Näherung ermöglicht es, die Mehrelektronen-Schrödingergleichung mit Hilfe gekoppelter Eielektronen-Schrödingergleichungen darzustellen und sie auf diese Weise zu lösen. Die Eielektronen-Schrödingergleichungen liefern Eielektronen-Zustandsfunktionen, die als Spinorbitale bezeichnet werden. Um das Antisymmetrie-Prinzip zu erfüllen (s. 2.2.4), wird aus den Spinorbitalen ( $\chi_n$ ) eine Slaterdeterminante gebildet. Die meisten Berechnungen erfolgen für sog. geschlossenschalige Systeme, bei denen jedes Molekülorbital (MO) jeweils ein  $\alpha$ - und ein  $\beta$ -Elektron aufnimmt. Dies resultiert in Spinorbitalen mit paarweise gleichen Ortsanteilen. Die Slaterdeterminante für  $n/2$  Molekülorbitale mit  $n$  Elektronen nimmt dabei folgende Gestalt an:

$$\psi_0(r) = \frac{1}{\sqrt{n!}} \begin{vmatrix} \psi_1(r_1)\alpha(1) & \psi_1(r_1)\beta(1) & \dots & \psi_{\frac{n}{2}}(r_1)\alpha(1) & \psi_{\frac{n}{2}}(r_1)\beta(1) \\ \psi_1(r_2)\alpha(2) & \psi_1(r_2)\beta(2) & \dots & \psi_{\frac{n}{2}}(r_2)\alpha(2) & \psi_{\frac{n}{2}}(r_2)\beta(2) \\ & & \cdot & & \\ & & \cdot & & \\ & & \cdot & & \\ \psi_1(r_n)\alpha(n) & \psi_1(r_n)\beta(n) & \dots & \psi_{\frac{n}{2}}(r_n)\alpha(n) & \psi_{\frac{n}{2}}(r_n)\beta(n) \end{vmatrix} \quad (2-8)$$

In Formel (2-8) entsprechen die Reihen allen möglichen Spin-Orbital Kombination für jedes  $i$ -te Elektron. Der Faktor vor der Determinante ist für die Normierung notwendig. Vertauschen von zwei Elektronen entspricht dem Vertauschen zweier Reihen in der Determinante und würde ihr Vorzeichen ändern. Dadurch wird die Antisymmetrie erfüllt und die Unbestimmtheit der Elektronenposition berücksichtigt.

Die Slater-Determinante, die den niedrigsten Energiemittelwert ( $E_0$ ) liefert, ist die Näherung für die Grundzustandsfunktion:

$$E_0 = \langle \psi_0 | \mathcal{H} | \psi_0 \rangle \quad (2-9)$$

Bei der HF-Methode wird der Grundzustand durch eine einzige Slater-Determinante angenähert. Um den niedrigsten Energiemittelwert zu ermitteln, wird ein Satz von Orbitalen bestimmt, für den die Energie minimal ist. Die Energieminimierung erfolgt mittels des Variationsansatzes. Dabei werden die HF-Gleichungen gelöst, die Bestimmungsgleichungen für die gesuchten optimalen Orbitale sind:

## 2. Theoretischer Teil

$$f(r_i)\psi_i(r_i) = \varepsilon_i\psi_i(r_i) \quad (2-10)$$

$f(i)$  ist dabei der effektive Eielektronen-Operator, der als Fock-Operator bezeichnet wird und wie folgt definiert ist:

$$f(i) = h(i) + \sum_{l=1}^{N/2} 2J_l(i) - K_l(i) \quad (2-11)$$

$h(i)$  erfasst dabei die kinetische Energie des  $i$ -ten Elektrons und die potentielle Energie der Anziehung zwischen  $i$ -ten Elektron und den Kernen.  $J_l(i)$  ist der Coulomb-Operator. Dieser entspricht dem mittleren lokalen Potential, das am  $i$ -ten Elektron durch das Elektron im Spinorbital  $\chi_l$  hervorgerufen wird. Der Austauschoperator  $K_l(i)$  ist ein nicht lokaler Operator und besitzt keine klassische Interpretation.

Für kleine Systeme wie Atome können die HF-Gleichungen direkt numerisch gelöst werden. Für die Bestimmung unbekannter molekularer Orbitale werden üblicherweise bekannte Basisfunktionen verwendet. Dazu wird jedes MO in einem Satz atomarer räumlicher Basisfunktionen  $\{\phi_\mu(r) | \mu = 1, 2, 3, \dots, K\}$  entwickelt (LCAO-Ansatz, von engl. *Linear Combination of Atomic Orbitals*):

$$\psi_i = \sum_{\mu=1}^K c_{\mu i} \phi_\mu \quad (2-12)$$

Durch Einsetzen von (2-12) in (2-10) und Integration werden die sog. Roothaan-Hall Gleichungen erhalten:

$$\sum_{\nu=1}^N (F_{\mu\nu} - \varepsilon_i S_{\mu\nu}) c_{\nu i} = 0 \quad \mu = 1, 2, \dots, N \quad (2-13)$$

Gleichung (2-13) kann in Matrixform geschrieben werden:

$$FC = SC\varepsilon \quad (2-14)$$

Die Fock-Matrix  $F$  ist dabei die Darstellung des Fock-Operators in Matrixform.  $C$  ist eine quadratische Matrix mit Entwicklungskoeffizienten  $c_{\nu i}$ .  $S$  ist die Überlappungs-

## 2. Theoretischer Teil

matrix, die die Überlappung zwischen den Orbitalen beschreibt.  $\varepsilon$  ist eine Diagonalmatrix, die Orbitalenergien  $\varepsilon_i$  enthält.

Sowohl Fock-Matrix als auch MO's sind von MO-Koeffizienten abhängig. Folglich ist die Gleichung (2-14) nicht linear und muss iterativ mit Hilfe der sog. Selbstkonsistenz-Methode (engl. *Self-Consistent Field, SCF*) gelöst werden. Dabei wird ein Satz von initialen MO-Koeffizienten vorgegeben, eine Fock-Matrix aufgestellt und die HF-Gleichungen gelöst. Mit dem neuen Satz von MO-Koeffizienten wird der Vorgang wiederholt bis Konvergenz erreicht ist, d.h. bis der Satz der  $C_{vi}$ -Koeffizienten sich nicht mehr ändert. Das Ergebnis dieser Berechnung sind K optimierte Molekülorbitale, wobei K der Anzahl der Basisfunktionen entspricht. Davon sind n/2 Molekülorbitale besetzt und K-n/2 MO's unbesetzt. Man bezeichnet diese auch als virtuelle Orbitale [30], [37].

### 2.2.4.2 Methode der Konfigurationswechselwirkung

Mit der Hartree-Fock (HF) Näherung kann die Gesamtenergie relativ gut berechnet werden. Dies gilt jedoch nicht für Energiedifferenzen wie z.B. Bindungsenergien oder Anregungsenergien. Dafür muss die Elektronenkorrelationsenergie ( $E_{corr}$ ) mit einbezogen werden (s. 2.2.4.1). Diese wird als Differenz zwischen der exakten nicht relativistischen Grundzustandsenergie des Systems ( $\varepsilon_0$ ) und der Hartree-Fock Energie ( $E_0$ ) definiert.

$$E_{corr} = \varepsilon_0 - E_0 \quad (2-15)$$

Ein Verfahren zur Berücksichtigung der Korrelationsenergie ist die Methode der Konfigurationswechselwirkung (engl. *Configuration Interaction, CI*). Hierbei wird die exakte Wellenfunktion als Linearkombination von Slater-Determinanten dargestellt:

$$\psi_{CI} = c_0\psi_0 + c_S\psi_S + c_D\psi_D + \dots \quad (2-16)$$

$\psi_0$  ist dabei die Grundzustandsdeterminante, die bei der Lösung der HF-Gleichungen erhalten wird.  $\psi_S$ ,  $\psi_D$  usw. sind angeregte Determinanten, die durch Substitution einer (engl. *single, S*) oder mehrerer besetzter Orbitale (engl. *double, D; triple, T*) durch virtuelle Orbitale zustande kommen. Die Energien werden mittels linearer Variationsverfahren bestimmt, wobei  $c_n$  die Variationskoeffizienten (CI-Koeffizienten)

sind. Die Eigenvektoren der CI-Matrix beschreiben die Zusammensetzung der jeweiligen Zustände [30], [31].

### 2.2.4.3 CASSCF

Im sog. Multi-Konfigurations-SCF Ansatz (MCSCF) geht man einen Schritt weiter: Zusätzlich zu den CI-Koeffizienten werden auch die MO-Koeffizienten für die jeweiligen Zustände optimiert. Da eine vollständige Variation aller Molekülorbitale in jeder Determinante für die meisten praxisbezogenen Fälle nicht möglich ist, wird das MCSCF-Verfahren auf situationsrelevante Molekülorbitale beschränkt. Ein Ansatz, sich auf die wichtigen Orbitale zu beschränken, der in dieser Arbeit verwendet wurde, ist das von Roos *et al.* entwickelte CASSCF-Verfahren (engl. *Complete Active Space Self Consistent Field*) [38]. Bei der CASSCF-Methode wird der Orbitalraum, der durch den ausgewählten Basissatz aufgespannt wird, in einen aktiven, einen inaktiven und einen externen Raum unterteilt. Die inaktiven Orbitale bleiben während der Berechnung immer doppelt besetzt, d. h. aus diesen Orbitalen findet keine Anregung statt. Im aktiven Raum (CAS-Fenster) wird eine *full-CI* Berechnung durchgeführt, wobei MO- und CI-Koeffizienten optimiert werden. Die Besetzungszahlen der aktiven Orbitale können zwischen Null und Zwei variieren. Die externen (inaktiven virtuellen) Orbitale bleiben zu jeder Zeit unbesetzt, in diese Orbitale findet folglich keine Anregung statt. Die gesamte CAS-Wellenfunktion entspricht der Linearkombination der Konfigurationen im inaktiven und aktiven Raum. Die externen Orbitale haben keinen Einfluss auf die CAS-Wellenfunktion, werden aber für die Orbitaloptimierung benötigt. Die Größe der kompletten CI-Entwicklung, die durch die Weyl-Formel bestimmt wird [39], steigt faktoriell mit der Anzahl der aktiven Elektronen und Orbitale an. Erfahrungsgemäß ist die Größe des aktiven Raums auf maximal 14 Orbitale beschränkt. Deshalb ist es wichtig, eine sinnvolle Auswahl der aktiven Orbitale zu treffen. Normalerweise werden Orbitale in den aktiven Raum eingeschlossen, die an dem untersuchten Prozess beteiligt sind oder aufgrund gleicher Symmetrie miteinander interagieren können, wie z.B. die  $\pi$ -Orbitale in konjugierten Polyenen. Dabei entspricht zumeist jedem bindenden Orbital im aktiven Fenster ein antibindendes Orbital. In vielen Berechnungen ist dadurch die Anzahl der aktiven Elektronen und Orbitale im CAS-Fenster identisch, jedoch sind auch verschiedene Kombinationen aktiver Elektronen und Orbitale möglich.

Die CASSCF-Methode wird auch für die Berechnung angeregter Zustände eingesetzt. Wenn mehrere angeregte Zustände gleichzeitig berechnet werden sollen (z.B.

## 2. Theoretischer Teil

für die Untersuchung konischer Durchdringungen), ist es üblich, zustandsgemittelte Wellenfunktionen (engl. *state-averaging*) anzuwenden. Mit Hilfe des *state-averaging* Verfahrens werden die Orbitale bezüglich der mittleren Energie  $E_{\text{mittl.}}$  von  $N$  angeregten Zuständen optimiert:

$$E_{\text{mittl.}} = \sum_i \omega_i E_i \quad (2-17)$$

Dabei sind  $\omega_i$  Wichtungen der zu berechnenden Zustände und  $E_i$ -Energien der  $i$ -ten Zustände. Das Ergebnis dieser Rechnung ist ein Satz von Orbitalen und  $N$   $CI$ -Funktionen. Mit dieser Methode soll eine gleichzeitige und gleich gute Berechnung mehrerer angeregter Zustände gewährleistet werden. Häufig müssen höher angeregte Zustände mit in die Berechnung eingeschlossen werden.

CASSCF-Berechnungen berücksichtigen hauptsächlich die sog. statische Korrelation. Sie liefern jedoch gute Orbitalbasen und Startkonfigurationen, um dynamische Effekte störungstheoretisch z.B. mit Hilfe der CASPT2-Methode (engl. *2nd order Complete Active Space Perturbation Theory*) zu untersuchen [32], [39].

### 2.2.4.4 CASPT2

#### Einzelzustands-CASPT2 (engl. single state, SS)

Folgendes Kapitel bezieht sich auf den Artikel von Finley *et al* [40].

Die Störungstheorie basiert auf der Unterteilung des Hamiltonoperators in zwei Teile:

$$H = H_0 + V \quad (2-18)$$

Dabei ist  $H_0$  der Hamiltonoperator nullter Ordnung mit bekannter Lösung,  $V$  ist eine Störung, die auf  $H_0$  angewendet wird und im Vergleich dazu klein ausfallen soll. Der Hilbertraum wird also in einen Referenzraum und einen sekundären Raum aufgeteilt:

$$P + Q = 1 \quad (2-19)$$

Der Referenzraum ist normalerweise eindimensional und wird durch einen CASSCF Referenzzustand  $|\alpha\rangle$  aufgespannt:

$$P = |\alpha\rangle \langle\alpha| \quad (2-20)$$

## 2. Theoretischer Teil

Dieser ist Eigenfunktion von  $H_0$  :

$$H_0|\alpha\rangle = E_0^\alpha|\alpha\rangle. \quad (2-21)$$

Der Wellenoperator  $\Omega^\alpha$  generiert den benötigten Zustand. Die Gleichung nullter Ordnung für den Wellenoperator ist gegeben durch:

$$(E_0^\alpha - H_0)\Omega_1^\alpha|\alpha\rangle = QH|\alpha\rangle \quad (2-22)$$

Mit der Energie zweiter Ordnung, die durch

$$E_{2\text{nd}}^\alpha = E_{1\text{st}}^\alpha + \langle\alpha|H\Omega_1^\alpha|\alpha\rangle \quad (2-23)$$

gegeben ist. Der Wellenoperator erster Ordnung wird durch den Hamiltonoperator erster Ordnung  $H_0$  und den Referenzzustand  $|\alpha\rangle$  vollständig bestimmt. Dabei entspricht  $H_0$ :

$$H_0^\alpha = |\alpha\rangle\langle\alpha|\hat{F}^\alpha|\alpha\rangle\langle\alpha| + \sum_k |k\rangle\langle k|\hat{F}^\alpha|k\rangle\langle k| + Q_{s_d}^\alpha \hat{F}^\alpha Q_{s_d}^\alpha + Q_{t_q}^\alpha \hat{F}^\alpha Q_{t_q}^\alpha \quad (2-24)$$

$\hat{F}^\alpha$  ist ein generalisierter Einteilchen-Fock-Operator und die Summe über  $k$  schließt alle Zustände ein, die orthogonal zum Referenzzustand sind.  $Q_{s_d}^\alpha$  ist ein Unterraum, der durch  $|pqrs; \alpha\rangle$  Zustände aufgespannt wird, die durch Doppelanregung bezogen auf den Referenzzustand generiert werden. Anregungen höherer Ordnung werden im Term  $Q_{t_q}^\alpha$  eingeschlossen. Die  $|pqrs; \alpha\rangle$  Zustände sind nicht orthogonal und linear abhängig.  $p, q, r, s$  sind Orbitalindizes. Kontrahierte Zustände, in denen  $p, q, r, s$  alle aktiv sind, werden in  $Q_{s_d}^\alpha$  nicht berücksichtigt. Unter Anwendung folgender Identitäten

$$QH|\alpha\rangle = Q_{s_d}^\alpha H|\alpha\rangle \quad (2-25)$$

$$Q_{s_d}^\alpha H_0^\alpha Q_{t_q}^\alpha = 0 \quad (2-26)$$

$$Q_{s_d}^\alpha H_0^\alpha Q_{s_d}^\alpha = Q_{s_d}^\alpha \hat{F}^\alpha Q_{s_d}^\alpha \quad (2-27)$$

## 2. Theoretischer Teil

kann Gleichung (2-22) wie folgt umgeschrieben werden:

$$(E_0^\alpha - \hat{F}^\alpha)Q_1^\alpha|\alpha\rangle = Q_{s_d}^\alpha H|\alpha\rangle \quad (2-28)$$

Gleichung (2-44) kann unter Verwendung der Zustände aus dem  $Q_{s_d}^\alpha$  Raum iterativ gelöst werden. Diese Zustände werden durch Orthogonalisierung der  $|pqrs; \alpha\rangle$  Zustände erhalten.

Bei Kopplung mehrerer Zustände (z.B. konische Durchdringung oder Rydberg Mischung) liefert SS-CASPT2 keine korrekten Ergebnisse. Dieses Problem wird mit Hilfe der Multizustands-CASPT2 Methode (engl. *Multi State, MS*) gelöst.

### MS-CASPT2

MS-CASPT2 verwendet einen multidimensionalen Referenzraum  $P$ , der durch einen oder mehr zustandsgemittelte CASSCF Zustände aufgespannt wird. Diese interagieren mittels eines effektiven Hamiltonoperators  $H^{eff}$ . Der Referenzraum  $P$  ist gegeben durch:

$$P = \sum_{\alpha=1}^d |\alpha\rangle \langle\alpha| \quad (2-29)$$

wobei  $d$  der Dimension des Referenzraums entspricht. Referenzzustände für MS-CASPT2 sind Eigenfunktionen des  $H_0^\alpha$ :

$$H_0^\alpha|\alpha\rangle = E_0^\alpha|\alpha\rangle \quad (\alpha = 1, 2, \dots, d) \quad (2-30)$$

Der Rest des Hilbertraums wird durch den Sekundärraum  $Q$  aufgespannt. Modellzustände  $\psi_p^0$  sind Projektionen auf die gesuchten Zustände  $|\psi_p\rangle$  im Referenzraum  $P$ :

$$P|\psi_p\rangle = |\psi_p^0\rangle \quad (p = 1, 2, \dots, d) \quad (2-31)$$

Der Wellenoperator  $\Omega^P$ , der die gesuchten Zustände generiert, wird nach Ordnungen entwickelt:

$$\Omega^P = 1 + \Omega_1^P + \Omega_2^P + \dots \quad (2-32)$$

## 2. Theoretischer Teil

$\Omega_n^P$  besitzt  $n$  Störungsfaktoren  $V$  besitzt. Der Hamiltonian nullter Ordnung ist dem in SS-CASPT2 ähnlich. Unter Verwendung ähnlicher Identitäten wird analog zu Gleichung (2-28) folgender Term erhalten:

$$(E_0^\alpha - \hat{F}^\alpha)\Omega_1^P|\alpha\rangle = Q_s^\alpha H|\alpha\rangle \quad (\alpha = 1, 2, \dots, d) \quad (2-33)$$

Dabei ist der Multireferenz-Wellenoperator  $\Omega_1^P$  eine Linearkombination der SS Wellenoperatoren:

$$\Omega_1^P|\alpha\rangle = \sum_k \Omega_1^\alpha|\alpha\rangle\langle\alpha| \quad (2-34)$$

Der effektive Hamiltonoperator  $H^{eff}$  ist gegeben durch:

$$H^{eff} = PH\Omega^P P \quad (2-35)$$

Er interagiert nur mit dem Referenzraum  $P$ . In zweiter Ordnung wird  $H^{eff}$  folgendermaßen definiert:

$$H_{2nd}^{eff} = PHP + PH\Omega_1^P P \quad (2-36)$$

Dabei werden die Diagonalelemente des  $H_{2nd}^{eff}$  durch die SS-CASPT2 Energien definiert:

$$\langle\alpha|H_{2nd}^{eff}|\alpha\rangle = E_{2nd}^\alpha \quad (\alpha = 1, 2, \dots, d) \quad (2-37)$$

Die MS-CASPT2 Methode ist nicht zeitaufwendiger als die SS-CASPT2 Methode und ist im MOLCAS Programmpaket als Standard-Ansatz implementiert [40].

### 2.2.4.5 DFT

Der grundlegende Unterschied der Dichtefunktionaltheorie (DFT) zu den bisher beschriebenen Methoden ist die Behandlung von Mehrteilchensystemen anhand der Elektronendichte anstatt elektronischer Wellenfunktionen. Die Wellenfunktion  $\psi$  für

## 2. Theoretischer Teil

ein  $N$ -Elektronensystem ist eine Funktion von  $3N$  Koordinaten  $\Psi = \Psi(\vec{x}_1, \dots, \vec{x}_N)$ , wobei  $\vec{x}_N$  drei räumliche Koordinaten  $\vec{r}$  und die Spinkoordinate  $s$  des  $N$ -ten Elektrons beinhaltet. Die Elektronendichte  $\rho(\vec{r})$  stellt die Wahrscheinlichkeit dar, irgendeines von  $N$  Elektronen im Volumenelement  $d\vec{r}$  zu finden. Sie ist gegeben durch:

$$\rho(\vec{r}) = N \int \dots \int |\Psi|^2 ds_1 d\vec{x}_2 \dots d\vec{x}_n \quad (2-38)$$

$\rho(\vec{r})$  hängt nur von drei räumlichen Koordinaten ab, unabhängig von der Elektronenanzahl. Durch Integration

$$\int \rho(\vec{r}) d\vec{r} = N \quad (2-39)$$

ergibt sich die Gesamtzahl der Elektronen pro Volumeneinheit. Gemäß den Theoremen von Hohenberg und Kohn wird die Grundzustandsenergie durch die Elektronendichte festgelegt und kann mittels Variationsansatzes erhalten werden. Die funktionale Beziehung zwischen der Energie und Elektronendichte wird als Dichtefunktional  $E(\rho)$  bezeichnet. Das Ziel der DFT-Methoden ist es dementsprechend, das Dichtefunktional anzunähern. Dieses kann in drei Energiefunktionale unterteilt werden: Die kinetische Energie,  $T(\rho)$ , die Anziehung zwischen den Kernen und Elektronen,  $E_{ne}(\rho)$  und die Abstoßung zwischen den Elektronen,  $E_{ee}(\rho)$ . Die Anziehung zwischen den Kernen und Elektronen kann in Form eines externen Potentials  $v(\vec{r})$ , das durch die Elektronendichte  $\rho(\vec{r})$  bestimmt ist, ausgedrückt werden:

$$E_{ne}[\rho] = \int v(\vec{r})\rho(\vec{r})d\vec{r} \quad (2-40)$$

$E_{ee}(\rho)$  schließt dabei den Coulombterm  $J[\rho]$  und den Austauschterm  $K[\rho]$  ein (analog zu HF-Methode). Um die kinetische Energie korrekt zu beschreiben, wird die sogenannte Kohn-Sham-Näherung angewendet. Das Konzept basiert auf der Einführung eines hypothetischen Systems mit nicht miteinander wechselwirkenden Pseudoelektronen (d.h. ohne Spin und Ladung). Die Lösung der Schrödingergleichung für dieses System ist durch eine Slaterdeterminante bestehend aus  $n$  Elektronen in  $n$  Kohn-Sham-Orbitalen  $\phi_i$  beschrieben. Für diese ist das Funktional für die kinetische Energie gegeben durch:

## 2. Theoretischer Teil

$$T_s[\rho] = \sum_i^n \left\langle \phi_i \left| -\frac{1}{2} \nabla^2 \right| \phi_i \right\rangle, \quad (2-41)$$

wobei der Index  $S$  auf die Slaterdeterminante hindeuten soll. Die Elektronendichte wird in Form von Eielektronen-Funktionen (Orbitalen) dargestellt:

$$\rho(\vec{r}) = \sum_i^n |\phi_i(\vec{r})|^2 \quad (2-42)$$

Die Orbitale können entweder numerisch bestimmt werden oder analog zur HF-Methode in einem endlichen Satz von Basisfunktionen entwickelt und mit SCF-Verfahren optimiert werden. Der Ausdruck für die kinetische Energie in Gleichung (2-41) basiert auf der Annahme unabhängiger Teilchen und berücksichtigt keine Elektronenkorrelation. Diese geht in das Austausch-Korrelations-Funktional  $E_{xc}[\rho]$  ein, wobei der allgemeine Ausdruck für die Energie folgende Gestalt annimmt:

$$E[\rho] = \int T_s[\rho] + E_{ne}[\rho] + J[\rho] + E_{xc}[\rho] \quad (2-43)$$

Das Hauptproblem der DFT-Methodik ist, eine passende Formel für das Austausch-Korrelations-Funktional zu finden, da dieses unbekannt und nicht direkt bestimmbar ist. Es wird mittels unterschiedlicher Ansätze angenähert. Mit dem *LDA*-Ansatz (engl. *Local Density Approximation*) erfolgt die Näherung durch Gleichsetzen der Elektronendichte mit einem homogenen Elektronengas. Eine Verbesserung im Vergleich zur LDA-Methode ist die GGA-Näherung (engl. *generalized gradient approximation*). Diese geht von der Annahme eines nicht homogenen Elektronengases aus, wodurch sich Inhomogenitäten in der Dichteverteilung besser beschreiben lassen. Dabei gehen die Ableitungen der Dichte in die Austausch- und Korrelationsenergien ein, wodurch die räumliche Änderung der Dichte erfasst wird. In dieser Arbeit wurden Hybridfunktionale eingesetzt. Bei Hybridfunktionalen entspricht ein Teil der Austauschenergie der exakten HF-Austauschenergie, der Rest der Austausch- und Korrelationsenergie kann durch andere Funktionale oder *ab initio* Methoden angenähert und/oder empirisch angepasst werden. Vorteile der DFT sind die mit dem HF-Ansatz vergleichbare Geschwindigkeit unter Berücksichtigung der Elektronenkorrelation.

## 2. Theoretischer Teil

Wenn die exakte Austausch-Korrelations-Energie bekannt wäre, dann würde die DFT-Methode die exakte Gesamtenergie des elektronischen Systems liefern [31], [32], [41].

### **2.2.4.6 DFT/MRCI**

Während für viele Probleme im elektronischen Grundzustand *CI*-Verfahren ausgehend von einer Referenzdeterminante ausreichend ist, werden angeregte Zustände mit einem Multireferenzansatz besser beschrieben. Im Rahmen des MRCI-Verfahrens (engl. *Multi-Reference Configuration Interaction*) werden die wichtigsten Konfigurationen zu der Referenzwellenfunktion hinzugefügt, aus der dann die Anregungen erfolgen. Mit dem MRCI-Ansatz wird die statische Korrelation gut beschrieben. Für die Berücksichtigung der dynamischen Korrelation sind viele Konfigurationen notwendig, was mit einem großen Rechenaufwand einhergeht. Im Gegensatz dazu wird mit der DFT-Methode die dynamische Korrelation schnell berechnet. Ein DFT/MRCI-Ansatz wurde von S. Grimme und M. Waletzke entwickelt, bei dem die statische Korrelation mit einer MRCI-Entwicklung beschrieben wird und Informationen aus der DFT-Rechnung (Orbitale und Energien) zur Berücksichtigung der dynamischen Korrelation eingesetzt werden. Um die Doppelzählung der dynamischen Korrelation zu vermeiden, wird eine spezielle Dämpfungsfunktion eingesetzt. Außerdem werden einige nicht molekülspezifische, aber funktionspezifische Parameter benötigt, die an experimentelle Daten angepasst wurden. DFT/MRCI eignet sich zur Untersuchung sowohl des Grundzustands als auch angeregter Zustände [41], [42].

## **2.3 Kraftfeldmethoden**

Systeme, die für quantenmechanische Berechnungen zu groß sind, können mit Kraftfeldmethoden (Molekülmechanik) untersucht werden. Bei der Molekülmechanik werden im Gegensatz zur Quantenmechanik keine Elektronenbewegungen berücksichtigt, die Energie des Systems hängt dabei nur von den Kernpositionen ab. Die Wechselwirkungen in einem molekülmechanischen System basieren auf Bindungsdehnung, Winkelbeugungen, Torsionen und uneigentlichen Torsionen (engl. *improper torsions*). Die Potentialenergie und ein Satz von Parametern definieren das Kraftfeld. Generell umfassen alle Kraftfelder mindestens vier Terme. Diese werden hier anhand des in dieser Arbeit verwendeten AMBER-Kraftfeldes [43] dargestellt:

## 2. Theoretischer Teil

$$\begin{aligned}
 E_{MM} = & \sum_{\text{Bindungen}} K_b (l_i - l_{i,0})^2 + \sum_{\text{Winkel}} K_\theta (\theta_i - \theta_{i,0})^2 \\
 & + \sum_{\text{Torsionen}} \frac{V_n}{2} (1 + \cos(n\phi - \delta)) \\
 & + \sum_{\text{nicht bindend}} \left( \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right)
 \end{aligned} \tag{2-44}$$

Der erste Term der Gleichung (2-44) entspricht der Wechselwirkung zwischen gebundenen Atompaaaren und wird durch ein harmonisches Potential beschrieben. Die Energie steigt mit der Änderung der Bindungslänge  $l_i$  gegenüber der Referenzbindungslänge  $l_{i,0}$ . Der zweite Term entspricht einer Summe über Abweichungen der Valenzwinkel  $\theta_i$  von Referenzwinkeln  $\theta_{i,0}$ . Der dritte Term gibt die Änderung der Energie in Abhängigkeit eines Torsionswinkels  $\phi$  wieder. Mit dem letzten Term werden nicht-bindende Wechselwirkungen modelliert. In den meisten Kraftfeldern erfolgt dies unter Verwendung von Coulomb-Potentialen für elektrostatische Wechselwirkungen und Lennard-Jones Potentialen für van der Waals Wechselwirkungen. Dabei sind  $A_{ij}$  und  $B_{ij}$  Lennard-Jones Parameter,  $q_i$  und  $q_j$  sind die atomaren Partialladungen,  $\epsilon_0$  ist die Dielektrizitätskonstante,  $r_{ij}$  ist der Abstand zwischen den Atomen  $i$  und  $j$ .  $K_b$ ,  $V_n$  sind Kraftkonstanten. Kraftkonstanten und Referenzwerte gehören zu den Parametern der Kraftfelder. Jedes Kraftfeld wird für bestimmte Zwecke (Molekülklasse, spezielle Eigenschaften) parametrisiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das AMBERff99SB-ILDN-Kraftfeld verwendet [44], welches spezielle Parameter für Proteine beinhaltet. Dieses basiert auf dem AMBER99SB-Kraftfeld, dem AMBER-Kraftfeld mit verbesserten Parametern für Diederwinkel des Proteinrückgrats [45]. Der Ausdruck für die Energie des AMBERff99SB-ILDN-Kraftfeldes setzt sich wie folgt zusammen:

$$E_{MM} = E_{A99SB} - V_{A99SB}(\theta) + k_0 + \sum_{n=1}^M k_n (1 + \cos(n\phi - \delta)) \tag{2-45}$$

Dabei wird von der Energie  $E_{A99SB}$  des AMBER99SB-Kraftfeldes der ursprüngliche Torsionsterm  $V_{A99SB}(\theta)$  durch den verbesserten Torsionsterm  $k_0 + \sum_{n=1}^M k_n (1 + \cos(n\phi - \delta))$  ersetzt. In diesem Term ist  $k_0$  eine Konstante,  $k_n$  sind die Kraftkonstanten für  $M$  Terme und  $\delta$  wurde gleich Null gesetzt [44]. Das AMBERff99SB-ILDN-

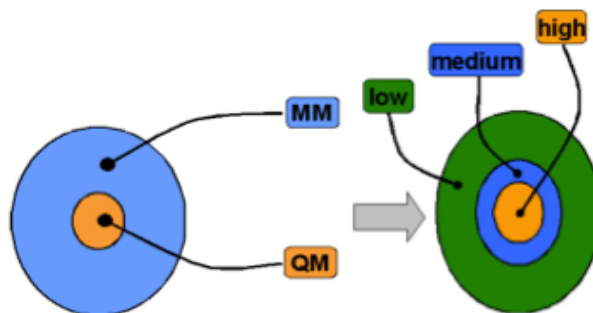
Kraftfeld stellt eine weitere Optimierung des AMBER99SB-Kraftfelds dar, in dem Parameter für Seitenketten-Torsionen verbessert werden. Diese beschränken sich auf die Aminosäuren Isoleucin (I), Leucin (L), Aspartat (D) und Asparagin (N), die in AMBERff99SB als besonders problematisch erschienen.

### 2.4 QM/MM-Methoden

Quantenmechanische Methoden (QM) können für verschiedene Fragestellungen in der Chemie angewendet werden. Mit QM-Verfahren lassen sich elektronische Eigenschaften von Molekülen zur Beschreibung chemischer bzw. photochemischer Reaktionen mittlerweile sehr präzise bestimmen. Deren Anwendbarkeit wird jedoch durch die Größe eines Systems limitiert. Große Systeme wie z.B. Proteine lassen sich sehr gut mit den zuvor beschriebenen molekularmechanischen Methoden (MM) beschreiben. Für Makromoleküle mit einer „wichtigen“ reaktionsfähigen Region (wie z.B. dem Channelrhodopsin) eignet sich eine Kombination von Quantenmechanik für den aktiven Teil (Chromophor) und Molekülmechanik für die Umgebung (Protein). Es gibt unterschiedliche Möglichkeiten, einen QM/MM-Ansatz zu implementieren: Durch Hinzufügen von QM-Funktionalität zu einem MM-Programm (z.B. Amber [44], [46], [47]), durch Hinzufügen MM-Funktionalität zu einem QM-Programm (z.B. Gaussian [48]) oder modular durch Zusammenführung der QM- und MM-Programme über ein Interface (z.B. ChemShell [49], COBRAMM [50]).

In dieser Arbeit wurde eine modulare Implementierung namens COBRAMM verwendet. Im Folgenden wird der QM/MM-Ansatz im Rahmen der COBRAMM-Implementierung erläutert. Das QM/MM-Verfahren lässt sich sowohl für Geometrieoptimierung als auch für Moleküldynamik anwenden. In dieser Arbeit wurde der QM/MM-Ansatz für Geometrieoptimierungen verwendet. Im ersten Schritt des QM/MM Ansatzes wird das System in QM- und MM-Region unterteilt (Abbildung 2-3, links). Neben der gewöhnlichen QM/MM-Unterteilung erfolgt in COBRAMM eine zusätzliche Unterteilung des Systems in drei Ebenen (engl. *layer*), die in Abbildung 2-3 rechts dargestellt ist. Die QM-Region entspricht dabei immer dem *high layer*. Die MM-Region lässt sich in zwei Ebenen unterteilen. Zu einer Ebene gehören Atome, die während der Simulation unbeweglich bleiben bzw. nicht optimiert werden. Diese Ebene wird als *low layer* bezeichnet.

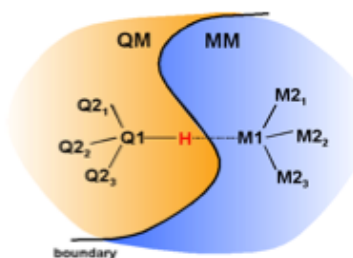
## 2. Theoretischer Teil



**Abbildung 2-3: Unterteilung des QM-Systems. Links: Unterteilung des Systems in QM- bzw. MM-Region. Rechts: Die zusätzliche Unterteilung in COBRAMM in *low*, *medium* und *high layer* [51].**

Eine weitere Ebene, *medium layer* genannt, enthält MM-Atome, die während der Simulation beweglich bleiben und gleichzeitig mit dem *high layer* (QM-Region) optimiert werden.

Die entstehende Grenze zwischen der QM- und MM-Region kann kovalente Bindungen durchschneiden. In diesem Fall bleibt am QM-Grenzatom eine ungesättigte Valenz zurück. Bei der Berechnung der QM-Region würde dies zu unphysikalischen Ergebnissen führen. Um dieses Problem zu umgehen, existieren verschiedene Strategien wie z. B. das Linkatom-Schema, Grenzatom-Verfahren oder Methoden mit fixierten lokalisierten Orbitalen [52]. In COBRAMM wird ein Linkatomschema verwendet, wobei die ungesättigte Valenz in der QM-Region durch Einführung eines zusätzlichen Atoms in diesem Fall Wasserstoff abgesättigt wird (Abbildung 2-4).

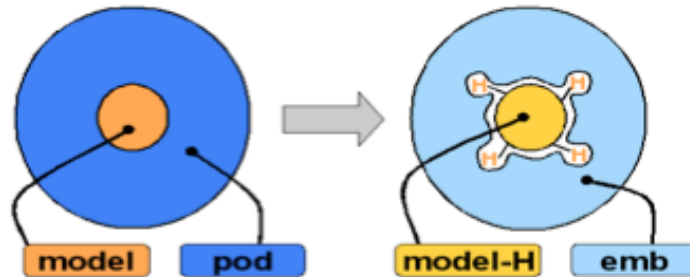


**Abbildung 2-4: Linkatomschema beim Durchschneiden der kovalenten Bindung an der Grenze zwischen QM- und MM-Region. Als  $Q_1$ - $Q_3$  werden die QM-Grenzatome bezeichnet.  $M_1$ - $M_3$  sind MM-Atome. H (rot) ist das Linkatom [51].**

Das QM-Grenzatom ( $Q_1$ ) ist dabei kovalent mit dem Linkatom (H) verbunden. Das Einführen von Atomen, die nicht zum ursprünglichen System gehören, kann zu Problemen bei Geometrieoptimierungen und bei der Berechnung der QM/MM-Gesamtenergie führen. Darum werden die Freiheitsgrade der Linkatome meist auf Bewegungen entlang der Verbindungsachse eingeschränkt.

## 2. Theoretischer Teil

Um Überpolarisation an der QM/MM Grenze durch zu geringe Abstände von Link- und MM-Grenzatomen zu vermeiden, wird die Ladung des M1 Atoms gleich Null gesetzt und auf die gebundenen M2 Atome (siehe Abbildung 2-4) verteilt. Diese neu erhaltene Ladungsverteilung wird im Nachfolgenden als *emb* (engl. embedding charges) bezeichnet, gegenüber der ursprünglichen Ladungsverteilung *pod* (engl. point charge original distribution, s. Abbildung 2-5).



**Abbildung 2-5:** Schema für die elektrostatische Einbettung. Links ist das System ohne Linkatom dargestellt. Model entspricht der QM-Region ohne Linkatom und *pod* den ursprünglichen Punktladungen vor der Einführung des Linkatoms. Rechts ist das System mit Linkatom dargestellt. Die *pod* Ladungen werden dementsprechend verändert. *Emb* entspricht den modifizierten *pod*-Punktladungen [51].

Die QM/MM-Energie wird in COBRAMM durch ein subtraktives Schema erhalten. Die Gesamtenergie ergibt sich zu:

$$E^{tot} = E_{MM}^{System} + E_{QM}^{model-H} + E_{QM}^{el.model-H/emb} - E_{MM}^{el.mod/pod} - E_{MM}^{model-H} \quad (2-46)$$

Die Indizes QM und MM bezeichnen dabei Terme, die entsprechend auf quantenmechanischem bzw. molekülmechanischem Niveau erfasst werden.  $E_{MM}^{System}$  ist die mit MM berechnete Energie des Gesamtsystems,  $E_{QM}^{model-H}$  beschreibt die Energie der QM-Region mit H-Link-Atomen.  $E_{QM}^{el.model-H/emb}$  ist die elektrostatische Wechselwirkung zwischen QM Wellenfunktion und Punktladungen der Umgebung, d. h. die Wellenfunktion wird durch die MM-Ladungen polarisiert. Von diesen Termen werden die MM Beiträge für die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen QM und MM Region  $E_{MM}^{el.model/pod}$  sowie die MM-Energie  $E_{MM}^{model-H}$  für die Atome der QM-Region abgezogen. Die Bezeichnung *model* im ersten Term entspricht den Atomen der QM-Region ohne Link-Atome.

Bindende und van-der-Waals Wechselwirkungen zwischen QM- und MM-Region werden allein auf MM-Level berücksichtigt [51], [52].

## 3 Methodik

Für alle nachfolgenden Rechnungen wurde eine auf 2,3 Å genau aufgelöste Kristallstruktur des Proteins C1C2 verwendet. Diese ist in der Proteindatenbank (PDB) unter der Kennung 3UG9 zu finden.

### 3.1 Erzeugen der Startstrukturen für QM/MM-Berechnungen

#### 3.1.1 Erstellung von Topologie- und Parameter-Dateien

Für nachfolgende MM- und QM/MM-Berechnungen müssen zunächst Topologie- und Parameterdateien für das verwendete Kraftfeld erzeugt werden. Alle nachfolgenden Schritte wurden mit Hilfe von *Amber* [47], [53], [54] und den dazugehörigen Programmpaketen ausgeführt. Es wurde eine Reihe von Näherungen vorgenommen sowie Anpassungen an das verwendete Kraftfeld durchgeführt. Dazu zählen die Zuweisung von Atomtypen und das Erzeugen fehlender Bibliotheken für so genannte Nicht-Standard-Reste. Diese Modifikationen sollen im Folgenden erläutert werden.

#### 3.1.2 Modifikationen und Näherungen

Als erste Näherung wurden in der Kristallstruktur aufgelöste einzelne Fettsäurereste nicht berücksichtigt. Diese entstammen der Membran, in die das Protein eingebettet ist. Der Einfluss der Membran besteht zum größten Teil darin, die Proteinstruktur zu stabilisieren. Um diesen Effekt zu reproduzieren, müsste die komplette Membran modelliert werden, da mit nur wenigen Fettsäuren keine Stabilisierung erreicht werden kann.

Da Wasserstoffatome in der Kristallstruktur nicht aufgelöst wurden, wurden diese mit Hilfe des Programms PDB2PQR [55], [56] hinzugefügt. Dieses protoniert Aminosäuren gemäß ihrer  $pK_a$ -Werte unter Verwendung des Programms PROPKA [57]–[60] und addiert die übrigen Wasserstoffatome gemäß der Valenzen der schweren Zentren. Der Retinalchromophor wurde in *gmolden* [61] an den entsprechenden Positionen manuell protoniert.

In der verwendeten Kristallstruktur wurden 53 Aminosäuren nicht aufgelöst, diese sind in Abbildung 3-1 entsprechend durch leere Stellen gekennzeichnet.



### 3.1.3 Erzeugen neuer Bibliotheken für Nicht-Standard-Reste

Die Bibliothek des Amber-Krauffelds enthält Parameter für Kombinationen von Bindungslängen, Winkeln, Diederwinkeln und Ladungen für alle proteinogenen Aminosäuren. Channelrhodopsin enthält jedoch Reste, die in der Amber-Bibliothek nicht definiert sind, sogenannte Nicht-Standard-Reste (engl. *non-standard residues*). Zu diesen gehört der Retinalchromophor sowie  $C_{\epsilon}$  und  $N_{\zeta}$  des Lys296 und dazugehörige Wasserstoffatome (im Nachfolgenden RET genannt) sowie der Rest des Lys296 (im Nachfolgenden LYP genannt). In Abbildung 3-3 sind die *non-standard residues* dargestellt.

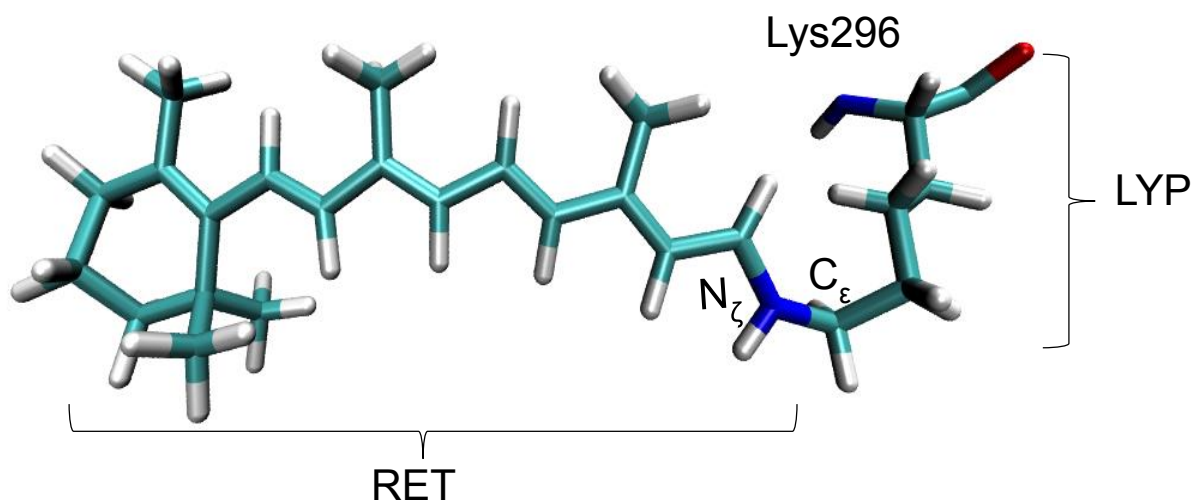


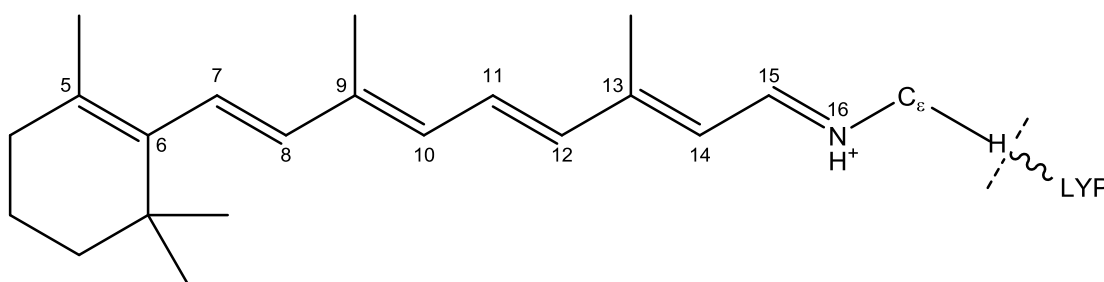
Abbildung 3-3: Nicht-Standard-Reste RET und LYP.

Für diese Reste müssen neue Bibliotheken erzeugt werden. Im ersten Schritt wurde dazu das elektrostatische Potential um das entsprechende Molekül (RET oder LYP) gemäß des Merz-Kollman-Schemas [62] mit HF/6-31G\* berechnet. Basierend darauf wurden mit dem Programm *antechamber* Punktladungen erzeugt. Die Verfügbarkeit der nötigen Parameter im benutzten Krauffeld wurde mit dem Programm *parmchk* überprüft. Fehlende Parameter wurden analog zu bereits vorhanden, ähnlichen Parametern eingefügt. Aus den erzeugten Dateien wurden neue RET- bzw. LYP-Bibliotheken erstellt, mit dessen Hilfe die benötigten Parameter/Topologiedateien erzeugt werden konnten. Parameter/Topologiedateien enthalten alle Informationen über das System, die für die Bestimmung der Energien, Energieminimierung und Moleküldynamik notwendig sind. Zu diesen zählen neben den erwähnten Geometrieparametern und Ladungen auch Informationen über Wasserstoffbrücken und interne Koordinaten. Die Koordinatendateien enthalten kartesische Koordinaten und werden während der Rechnungen aktualisiert. Parameter/Topologie- und Koordinatendateien

### 3. Methodik

wurden mit dem Programm *Leap* erzeugt. Nach Laden von Kraftfeld, RET/LYP-Bibliotheken und PDB-Datei wurde eine Bindung zwischen RET und LYP zugefügt und das System durch Addition eines Chloridions neutralisiert. Nach Speichern der Parameter/Topologie-Datei (*real.top*) und Koordinaten-Datei (*real.crd*) wurde die Position der zugefügten Wasserstoffatome und Schutzgruppen (ACE und NME) in jeweils 250 Zyklen mit dem *Steepest Descent* und dem *Conjugated Gradient* Verfahren auf MM-Niveau minimiert.

Die QM-Region setzte sich aus der Retinal-Schiff-Base und der dazugehörigen  $\epsilon$ -CH<sub>2</sub>-Gruppe des Lysins nach Absättigung mit einem Wasserstoffatom zusammen (Abbildung 3-4).



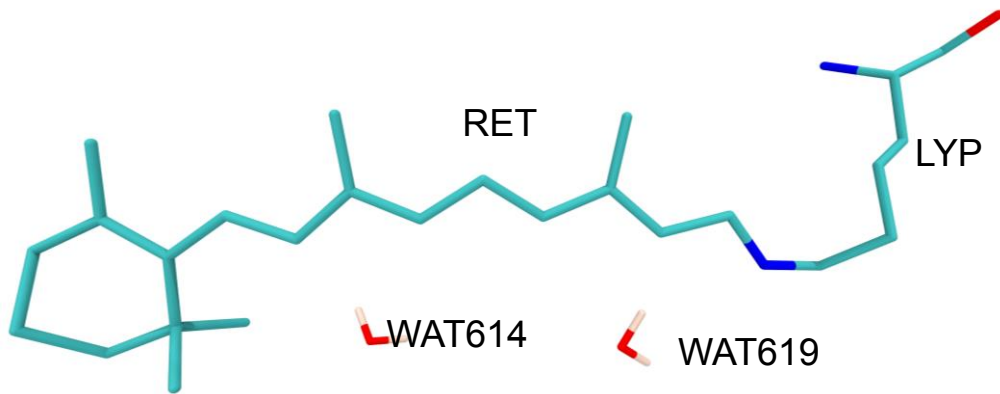
**Abbildung 3-4: QM-Region bestehend aus Retinal-Schiff-Base und der dazugehörigen  $\epsilon$ -CH<sub>2</sub>-Gruppe des Lysins. Mit gestrichelter Linie ist die QM/MM-Grenze gekennzeichnet. Das H-Atom dient zur Absättigung der QM-Region.**

Für dieses Modell wurde eine separate Parameter/Topologiedatei erzeugt, wobei dem hinzugefügten Wasserstoff-Linkatom ein neuer Atomtyp (Atomlink, AL) zugewiesen wurde. Auf diese Weise wurden insgesamt zwei verschiedene Startstrukturen mit unterschiedlichen Protonierungszuständen der Gegenionen Asp292 und Glu162 erstellt. In der *Standard-Protonierung* liegen beide Gegenionen entsprechend den mit PROPKA berechneten pK<sub>a</sub>-Werten deprotoniert vor. In einem weiteren Modell liegt Glu162 nach dem Vorschlag von Kamiya *et al.* (s. Kapitel 1) in protonierter Form vor (GLH162-Struktur).

#### 3.1.4 Verwendete Modelle

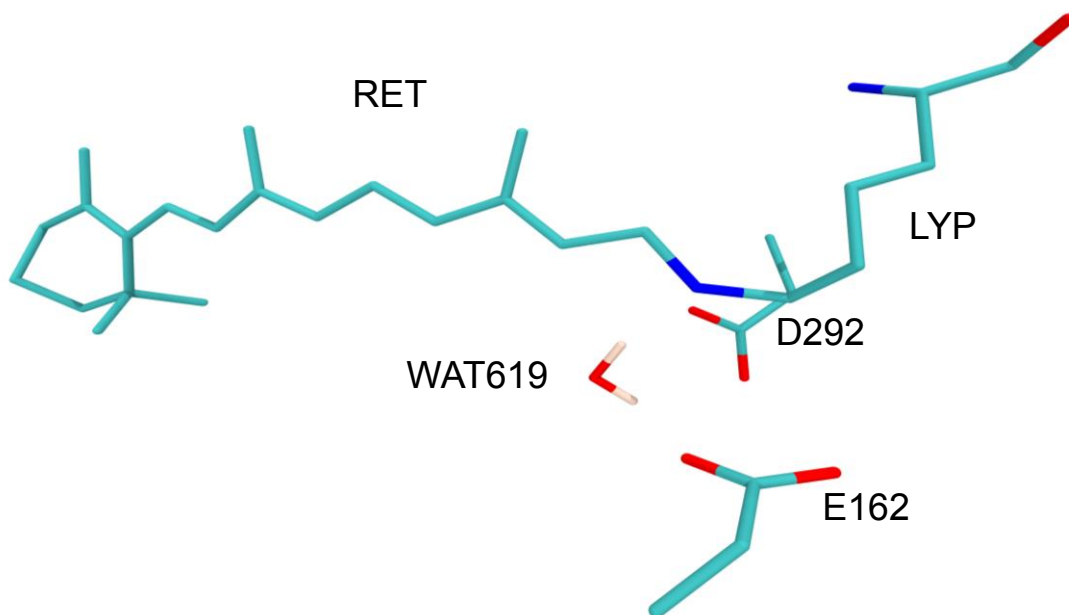
Für QM/MM-Geometrieoptimierungen wurden Modelle mit verschiedenen beweglichen MM-Regionen um den Retinalchromphor erzeugt. Im ersten Modell (**FP**, *frozen pocket*) blieben während der Optimierung die Retinal-Schiff-Base (RET), das Lysin (LYP) sowie die benachbarten Wassermoleküle WAT614 und WAT619 beweglich (s. Abbildung 3-5). Im Gegensatz zum Wassermolekül WAT614 war WAT619 bei allen Geometrieoptimierungen beweglich. Der Rest der Proteinumgebung wurde bei den Positionen der Kristallstruktur festgehalten.

### 3. Methodik



**Abbildung 3-5: Das FP-Modell. Wassermoleküle sowie RET und LYP sind beweglich. Wasserstoffatome sind nur bei Wassermolekülen abgebildet.**

Um den Einfluss der Gegenionen zu verfolgen, wurden in einem erweiterten Modell zusätzlich die Gegenionen Asp292 (D292) und Glu162 (E162) beweglich gehalten. Dieses Modell wird im Folgenden als **E\_D** bezeichnet (Abbildung 3-6).



**Abbildung 3-6: Das E\_D Model. Asp292 (D292), Glu162 (E162), WAT619, LYP und RET sind beweglich. Wasserstoffatome sind nur beim Wassermolekül abgebildet.**

In Anlehnung an den Artikel von *Kamiya et al.* (s. Kapitel 1) wurden weitere 12 Aminosäuren aus der Proteintasche bei der Optimierung freigelassen (Abbildung 3-7).

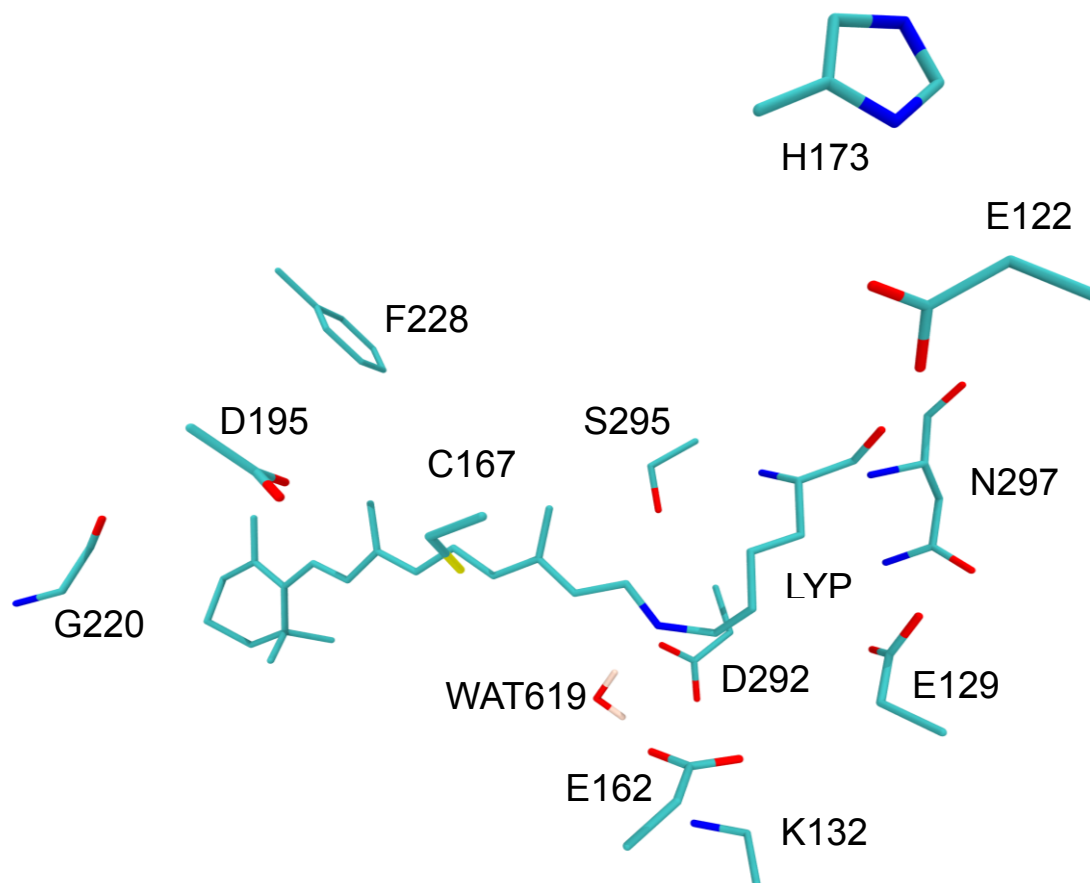


Abbildung 3-7: Das MP-Modell. 12 Aminosäuren aus der Proteintasche, WAT619, LYP und RET waren beweglich. Wasserstoffatome sind nur beim Wassermolekül abgebildet.

Dieses Modell wird nachfolgend als **MP** (*mobile pocket*) bezeichnet.

### 3.2 QM/MM-Geometrieoptimierungen

QM/MM-Geometrieoptimierungen im Grundzustand wurden mit COBRAMM durchgeführt. Die Berechnungen des QM-Teils erfolgten mit *Molpro 2010.1* [63]. Der aktive Raum für CASSCF-Berechnungen wurde entsprechend der Problemstellung gewählt. Die Startwellenfunktion dafür wurde mit Hilfe von RHF-Berechnungen erhalten. Die DFT-Geometrieoptimierung erfolgte unter Verwendung des B3LYP-Hybridfunktionals [64]–[68]. Für alle QM-Rechnungen wurde der 6-31G\* Basissatz [69] verwendet. Für MM-Berechnungen wurde das Programmpaket *Amber* eingesetzt. Die Geometrieoptimierungen wurden mit dem Berny-Algorithmus von *Gaussian09* [48] realisiert.

Die Geometrieoptimierung im angeregten Zustand erfolgte analog zur Geometrieoptimierung im Grundzustand mit Zustandsmittelung (*state-average*).

### 3.3 Berechnung der Anregungsenergien

Die vertikalen Anregungsenergien wurden unter Verwendung von CASPT2- und DFT/MRCI-Methoden berechnet. Die CASPT2-Berechnungen erfolgten mit dem MOLCAS 6.4-Programmpaket [70]. Mit Hilfe von CASPT2 wurden die Anregungsenergien der fünf niedrigsten Zustände berechnet. Die Berechnung erfolgte unter Verwendung des 6-31G\* Basissatzes. Startorbitale für die CASSCF-Rechnung wurden auch hier mit der RHF-Methode generiert. Die Symmetrie der Orbitale wurde optisch beurteilt und die Orbitale wurden bei Bedarf neu sortiert, bis alle  $\pi$ -Orbitale im aktiven Raum erfasst wurden. Der aktive Raum bestand aus 12  $\pi$ -Elektronen in 12  $\pi$ -Orbitalen (CASSCF (12,12)). Die *state-averaged*-CASSCF-Rechnung mit Mittelung über die fünf Zustände lieferte Referenzkonfigurationen für den *single-state* (SS)- und *multi-state* (MS)-CASPT2-Ansatz. Die gesamte Proteinumgebung wurde in Form von Punktladungen (emb. s. Kapitel 2.4) berücksichtigt. Die Berechnung der Anregungsenergien im Vakuum erfolgte ohne Berücksichtigung der Punktladungen. Die vertikalen DFT/MRCI Anregungsenergien wurden mit Hilfe des Programmpakets Turbomole 6.4 [71] berechnet. Dazu wurde die SVP-Basis [72] und das BHLYP-Funktional (engl. *Becke's half-and-half exchange in a combination with the LYP correlation functional*) verwendet [64]–[67], [73].

### 3.4 Moleküldynamik (MD)-Simulationen

MD-Simulationen erfolgten mit dem Amber-Programmpaket. Für die Simulation im expliziten Solvens wurde das TIP3P-Wassermodell verwendet. Die initiale Minimierung wurde basierend auf *Steepest Descent*- und *Conjugated Gradient*-Methoden durchgeführt. Temperaturkopplung an das Wärmebad erfolgte mit Hilfe des Langevin Thermostats. Die nichtbindenden Wechselwirkungen wurden bis zu einem Abstand von 12 Å berücksichtigt (*cut-off*).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 QM/MM-Geometrieoptimierung im Grundzustand und Charakterisierung der Zustände

QM/MM-Geometrieoptimierungen wurden basierend auf Startstrukturen aus Kapitel 3.1.3 und Modellen aus Kapitel 3.1.4, wie in 3.2 beschrieben, ausgeführt.

Für die Beschreibung des QM-Teils wurden jeweils RHF, DFT/B3LYP und CASSCF Methoden verwendet und gegenübergestellt. Der aktive Raum für CASSCF-Berechnungen bestand aus 12  $\pi$ -Elektronen in 12  $\pi$ -Orbitalen (CASSCF(12,12)).

Mit Hilfe von CASPT2 wurden die Anregungsenergien der fünf niedrigsten Zustände für die HF-, DFT/B3LYP- und CASSCF-optimierten Retinalstrukturen berechnet. Zusätzlich wurden für alle optimierten Strukturen die vertikalen Anregungsenergien der zehn niedrigsten Zustände mit DFT/MRCI berechnet. Davon wurden die fünf niedrigsten Zustände mit den CASPT2-Zuständen verglichen. Zur Charakterisierung der Zustände wurden Konfigurationen mit einem Gewicht  $\geq 10\%$  hinzugezogen.

#### 4.1.1 QM/MM-Geometrieoptimierung-Standard-Protonierung

Die durchgeführten Strukturoptimierungen zeigten ähnliche Trends hinsichtlich der Änderungen am Schiff-Base Terminus. Abbildung 4-1 zeigt exemplarisch eine Überlagerung des CASSCF-optimierten FP-Modells (RET, orange) und der H-substituierten Kristallstruktur (türkis).

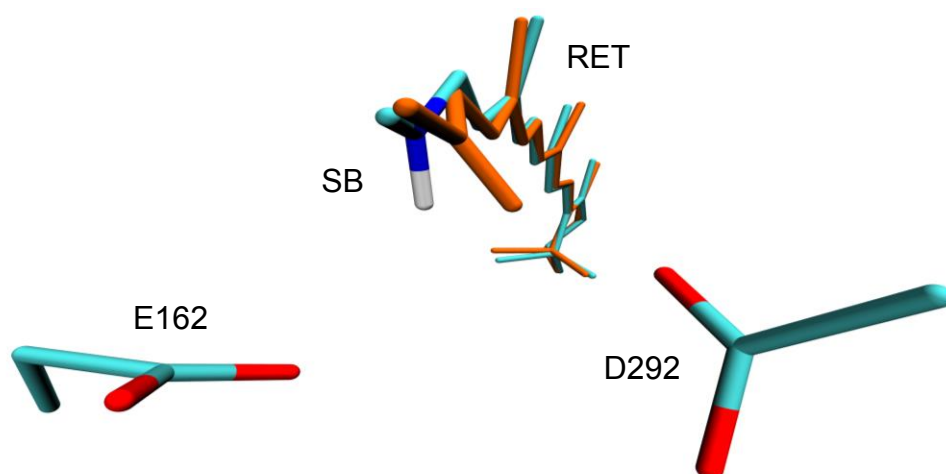
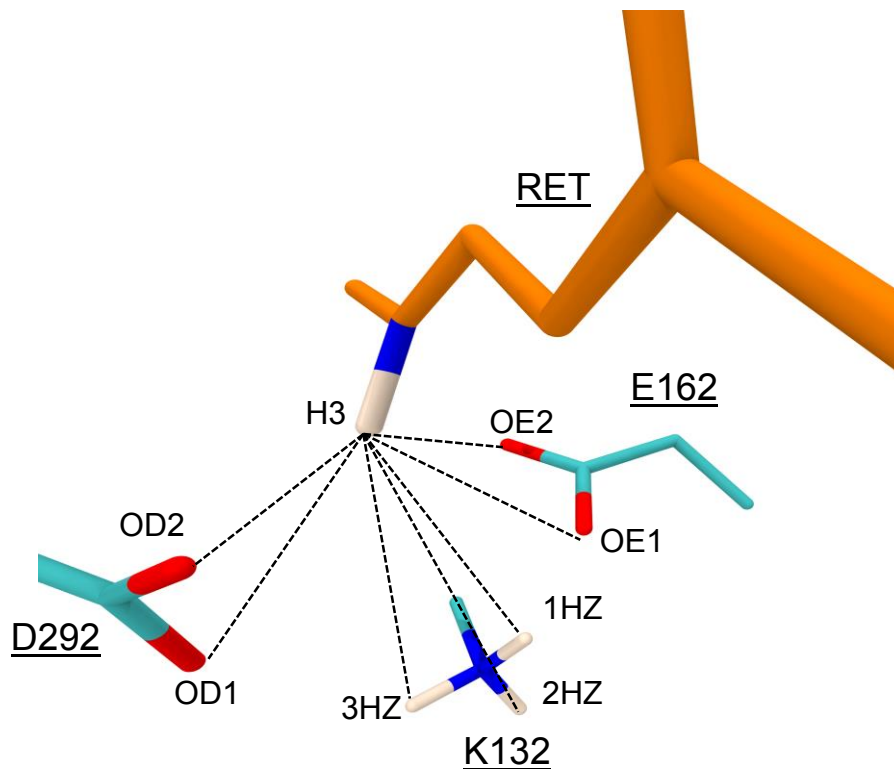


Abbildung 4-1: Überlagerung der Kristallstruktur (türkis) und der CASSCF-optimierten FP-Struktur (orange) sowie Gegenionen E162 und D292.

Bei allen Geometrieoptimierungen wurde eine Verdrillung des Schiff-Base (SB)-Terminus in Richtung des Gegenions Aspartat (D292) beobachtet. Diese Ver-

#### 4. Ergebnisse

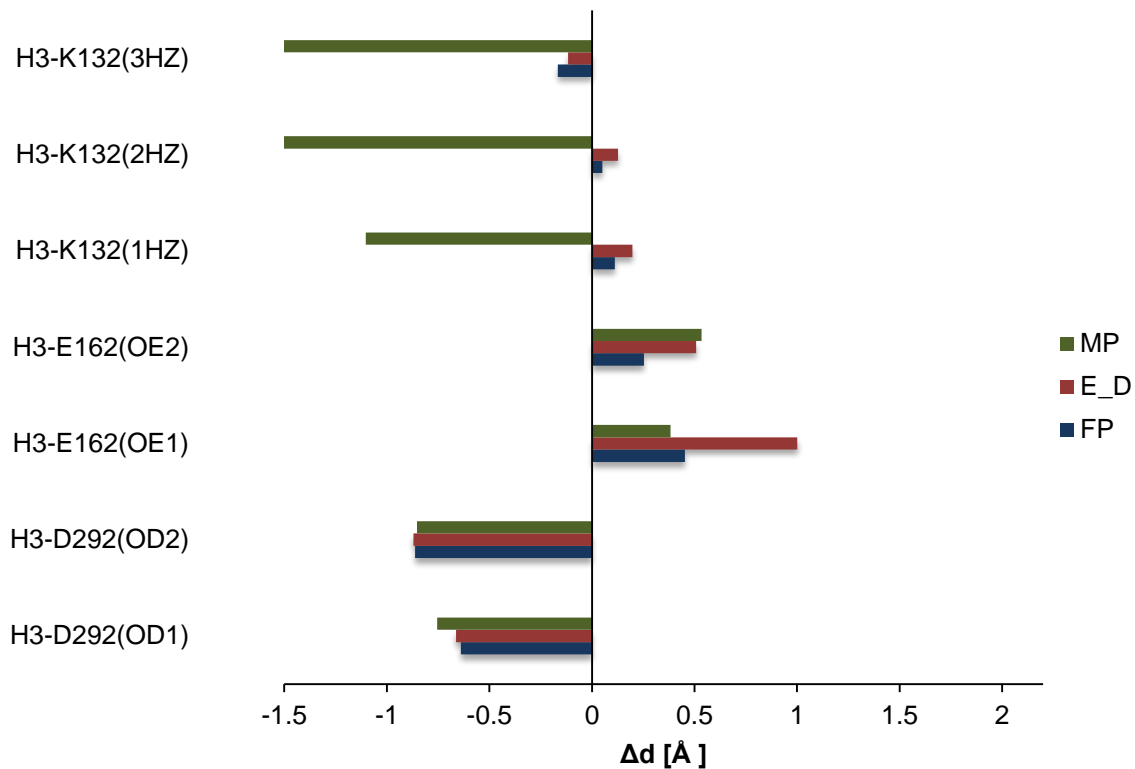
dringung liefert bereits einen Hinweis auf D292 als möglichen Protonenakzeptor im Photozyklus des Channelrhodopsins. Um die Geometrieänderung gegenüber der Kristallstruktur quantitativ beurteilen zu können, wurden die Abstände zwischen dem Wasserstoffatom der Schiff-Base (H3) und den benachbarten geladenen Aminosäurenresten (D292, E162, K132) analysiert. Die ausgewählten Abstände sind in Abbildung 4-2 schematisch dargestellt.



**Abbildung 4-2: Gemessene Abstände für die Untersuchung der Abstandsänderung. Dargestellt sind die Namen der Moleküle (unterstrichen) und die entsprechenden Atomtypen.**

Abbildung 4-3 zeigt exemplarisch für die HF-optimierten **FP**-, **E\_D**- und **MP**-Modelle die Differenz der jeweiligen Abstände zur Kristallstruktur. Die Ergebnisse für DFT/B3LYP- und CASSCF-optimierte Strukturen zeigen ein ähnliches Verhalten und befinden sich im Anhang A 1 (Abbildung A 1-1). Die negativen Werte in Abbildung 4-3 entsprechen einer Verringerung der Distanz und positive Werte einer Vergrößerung der Distanz zwischen dem Chromophor und den ausgewählten Aminosäurenresten gegenüber der Kristallstruktur.

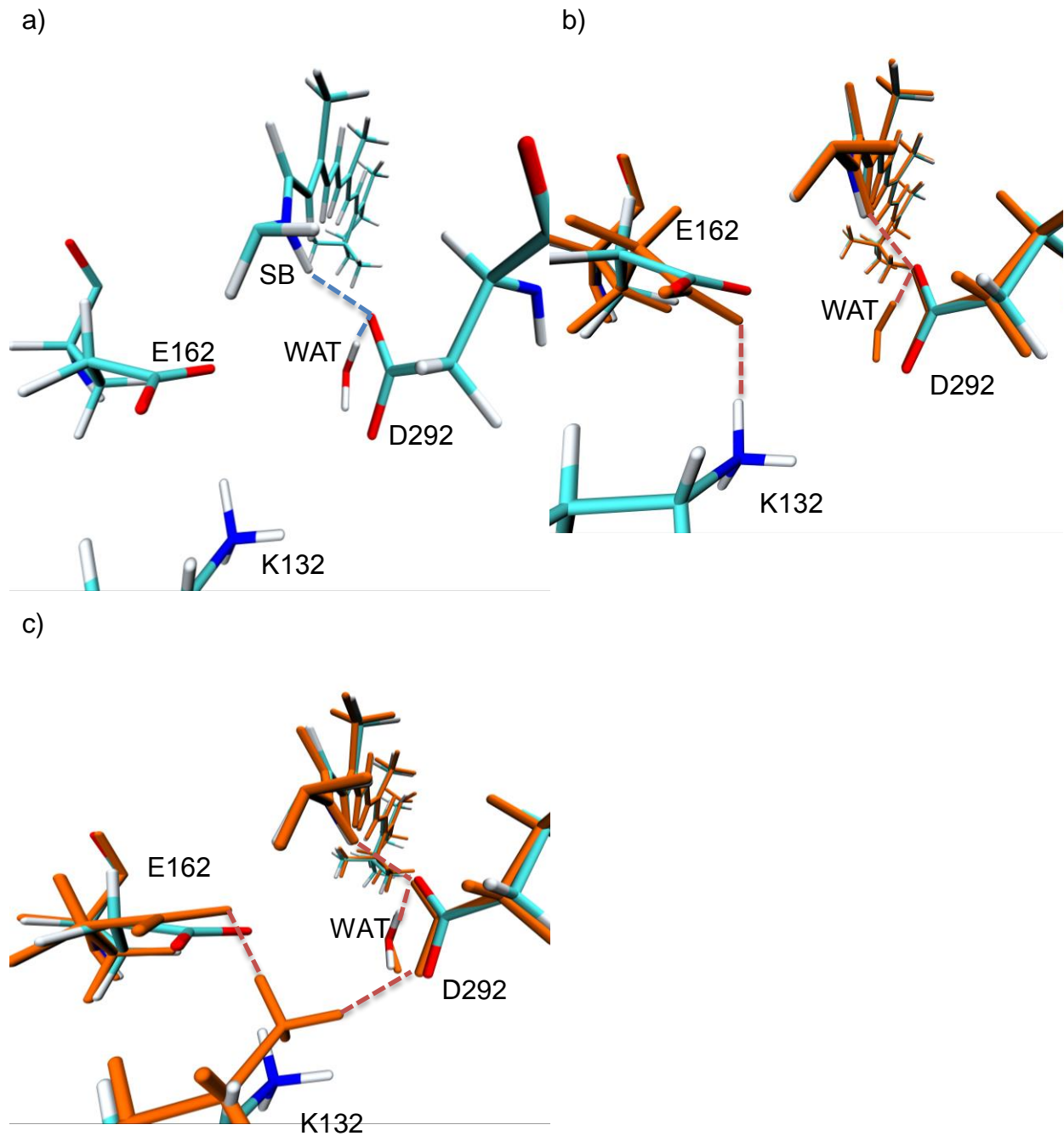
## 4. Ergebnisse



**Abbildung 4-3: Differenz der Abstände zur Kristallstruktur ( $\Delta d$ ) für FP- (blau), E\_D- (braun) und MP-Modelle (grün) im Rahmen der HF-Geometrieoptimierung in der Standard-Protonierung. Die Abstände entsprechen der Darstellung in Abbildung 4-2.**

Es zeigt sich, dass im **MP**-Modell der Abstand zwischen Schiff-Base und positiv geladenem Lys132 deutlich kleiner wird (bis zu 1.5 Å), während in den anderen Modellen diese Änderung eher gering ausfällt. In allen Modellen vergrößert sich der Abstand zum negativ geladenen Glu162. Die größte Änderung ist beim **E\_D**-Modell zu verzeichnen (ca. 1 Å). Gleichzeitig verringert sich der Abstand zum zweiten Gegenion, Asp292, in allen Modellen um ca. 0.6 - 0.8 Å. Die Position der Wassermoleküle ändert sich während der Optimierungen kaum. In Abbildung 4-4 wird die HF-optimierte **FP**-Struktur (a) mit den **E\_D**- (b) und **MP** (c)-Modellen zum Vergleich überlagert. Alle Abbildungen zeigen eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Proton der Schiff-Base, Asp292 und dem benachbarten Wassermolekül. Im **E\_D**-Modell ändert das Glutamat-Gegenion (E162) seine Position und bildet eine zusätzliche Wasserstoffbrücke mit dem Lysinrest (K132). Im **MP**-Modell kehrt E162 beinahe an seine ursprüngliche Position im **FP**-Modell zurück, wobei der Lysinrest sich in Richtung des Glutamats bewegt.

## 4. Ergebnisse

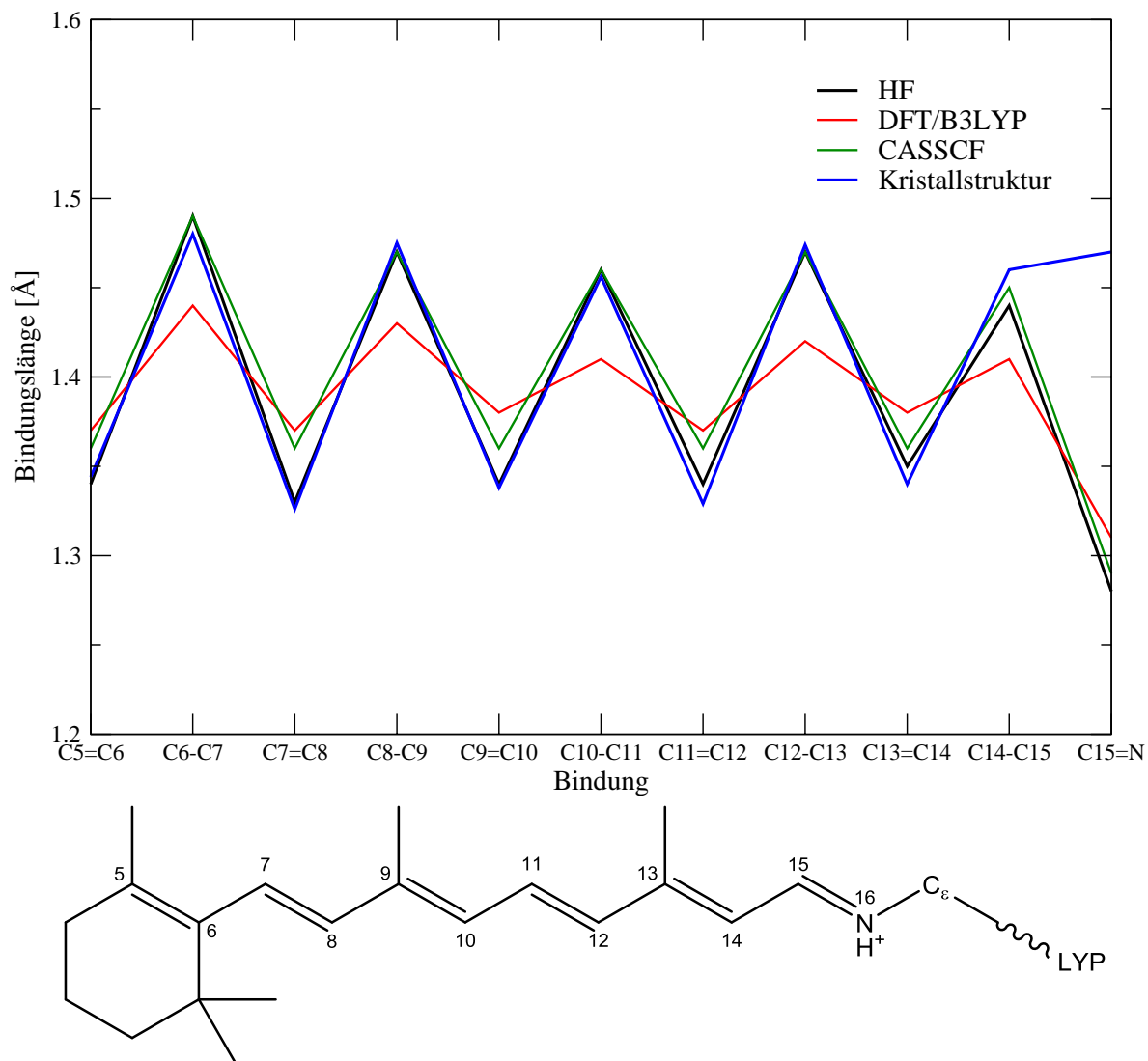


**Abbildung 4-4: a) HF-optimierte FP-Struktur, b)-c) Überlagerung der HF-optimierten FP-Struktur mit den Strukturen der E\_D- und MP-Modelle (orange)**

Auf diese Weise kann K132 Wasserstoffbrücken mit beiden Gegenionen ausbilden. Der Einfluss der ausgewählten QM-Methoden auf die Retinal-Struktur wurde anhand der Bindungslängen beurteilt. Abbildung 4-5 (oben) zeigt die Bindungslängen entlang der Polyenkette des Retinalchromphors, die bei der Optimierung des Retinals mit HF, DFT/B3LYP und CASSCF erhalten wurden im Vergleich zur Kristallstruktur. Die Bindungslängen der Kristallstruktur sind bis auf die C15=N Bindung mit den Bindungs-

## 4. Ergebnisse

längen der HF-Struktur vergleichbar. Im Gegensatz zu anderen Strukturen hat die C15=N Bindung der Kristallstruktur keinen Doppelbindungscharakter.

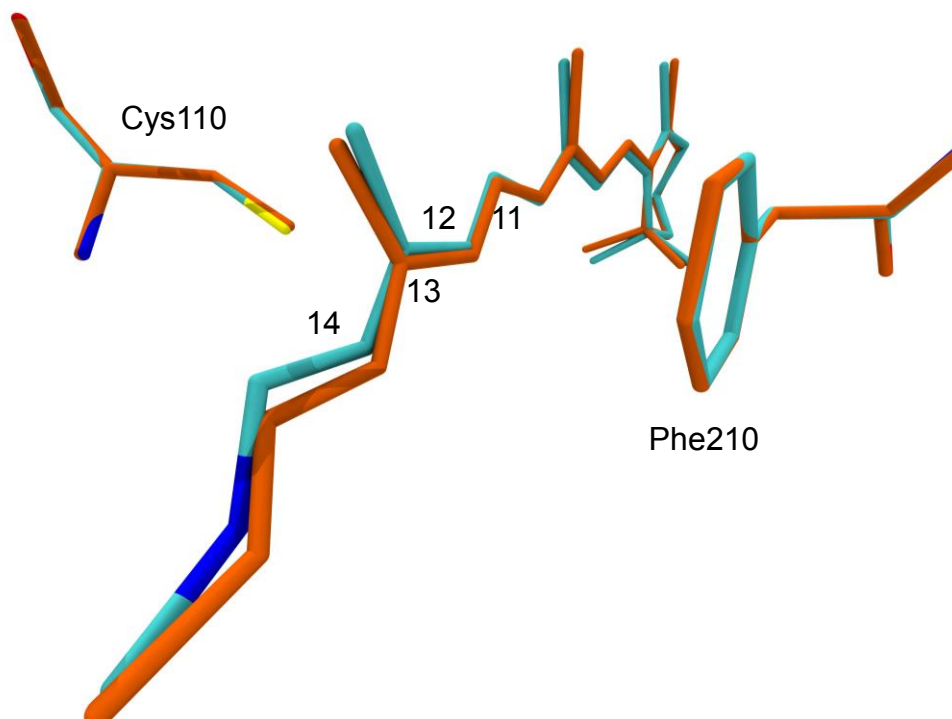


**Abbildung 4-5: Bindungslängen der Retinal-Polyenkette in der Kristallstruktur und in den HF-, DFT/B3LYP- und CASSCF-optimierten Geometrien. Unten ist die Retinalstruktur mit der entsprechenden Nummerierung der Kohlenstoffatome aufgeführt.**

Im Vergleich zu anderen Optimierungsmethoden zeigt die HF-Geometrie die höchste Bindungsalternanz. Dies ist auf die unzureichend berücksichtigte Elektronenkorrelation zurückzuführen und führt zu einem System mit kurzen Doppelbindungen und langen Einfachbindungen. Bei der CASSCF-Geometrie wird die Bindungsalternanz durch Berücksichtigung der statischen Elektronenkorrelation etwas weniger überbewertet. Dies macht sich besonders bei den Doppelbindungen bemerkbar, die im Vergleich zu HF länger werden. Jedoch ist der Einfluss der Korrelation durch die Auswahl des aktiven Raums begrenzt, so dass die Bindungsalternanz insgesamt immer noch vergleichsweise hoch bleibt. Bei der DFT-Geometrie führt die Delokalisierung der Elektronendichte zu einer Unterbewertung der Bindungsalternanz.

## 4. Ergebnisse

Anhand der Abweichung von  $180^\circ$  wurden die Torsionswinkel des Retinals ab C6-C7 bis zur C15=N Bindung analysiert. Im Rahmen der jeweiligen Optimierungsmethoden fallen die Diederwinkel-Abweichungen für **FP**-, **E\_D**- und **MP**-Modelle ähnlich aus (s. Anhang A 1, Abbildung A 1-2). Die größte Abweichung von  $180^\circ$  ( $22^\circ$ ) zeigt die CASSCF-optimierte **MP**-Struktur bei der Torsion um die C14-C15 Bindung. Des Weiteren macht sich eine signifikante Abweichung von der Kristallstruktur bei allen optimierten Modellen ab der C10-C11 Bindung bemerkbar. Dabei weist die Torsion um die C12-C13 Bindung bei allen Modellen einen Richtungswechsel auf. Um dies zu verdeutlichen ist in der Abbildung 4-6 die Kristallstruktur mit der CASSCF-optimierten **FP**-Struktur überlagert.

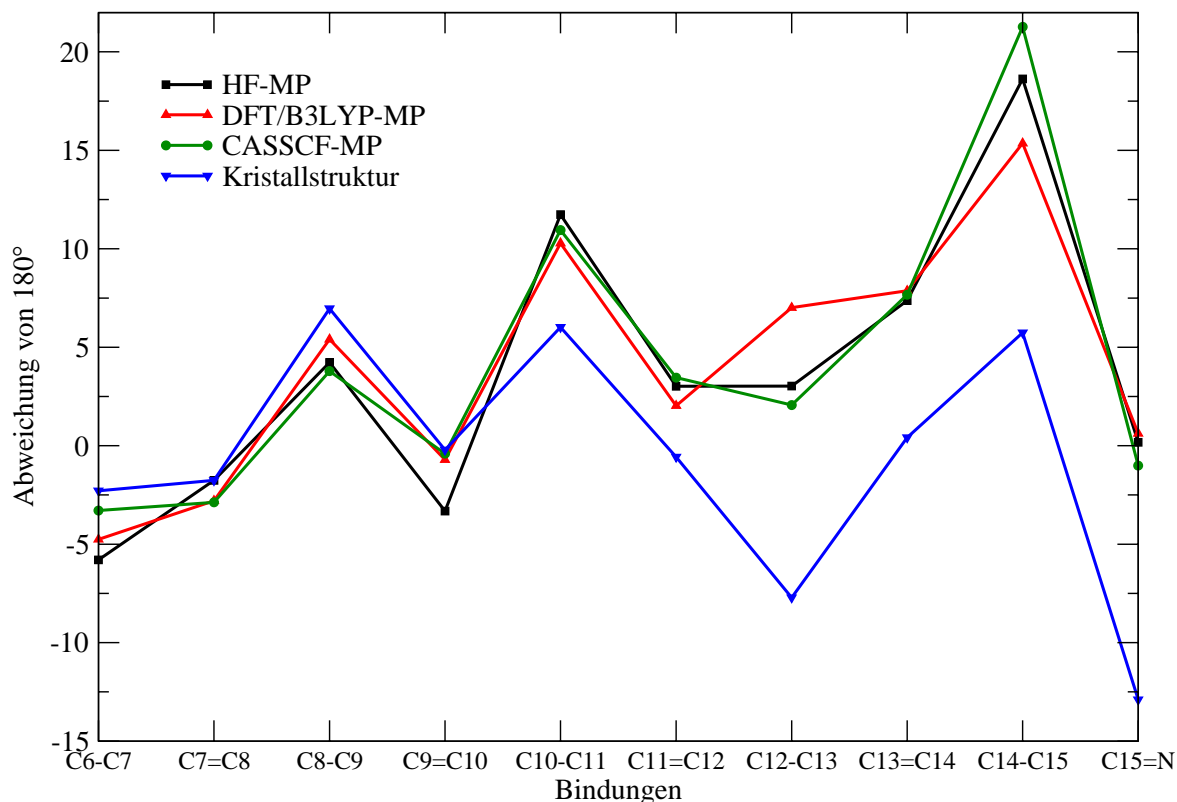


**Abbildung 4-6:** Überlagerung der Kristallstruktur (türkis) mit dem CASSCF-optimierten FP-Modell. Zusätzlich sind die Aminosäurenreste Cys110 und Phe210 abgebildet, die sich in der Nähe des Retinals befinden.

Wie in Abbildung 4-6 zu sehen, befinden sich in der Nähe der C12-C13 Bindung 2 Aminosäurenreste: Cys110 und Phe210. Eine günstigere Position für die C13-Methylgruppe wäre möglichst weit vom sperrigen Phenylrest. Auf der anderen Seite wird die Bewegung der Methylgruppe durch den Cysteinrest begrenzt. Während der Optimierung wird durch eine starke Verdrillung des Schiff-Base-Terminus das C13-Atom leicht verschoben, so dass sich der Abstand zwischen Cys110 und dem C13 um  $0.1 \text{ \AA}$  relativ zur Kristallstruktur vergrößert. Auf diese Weise bekommt die C13-Methylgruppe mehr Raum um dem Phenylrest auszuweichen. Dadurch kommt es zum Richtungswechsel der Torsion um die C12-C13 Bindung.

## 4. Ergebnisse

Der Vergleich der unterschiedlichen Optimierungsverfahren untereinander zeigt für die **FP**- und **E\_D**-Modelle einen nahezu identischen Trend (s. Anhang A 1, Abbildung A 1-3). Bis auf die C12-C13 und C13=C14 Bindungen erkennt man eine Alternanz, d.h. abwechselnd eine kleine und etwas größere Abweichung von 180°. Mit Ausnahme der DFT/B3LYP-optimierten Struktur lässt sich diese Tendenz ebenfalls auf die MP-Modelle übertragen (Abbildung 4-7).



**Abbildung 4-7:** Diederwinkelanalyse für MP-Modelle nach HF-, DFT/B3LYP und CASSCF-optimierungen.

Beim DFT/B3LYP-**MP**-Modell ist zwischen den Torsionen um die C11=C12 und C12-C13 Bindungen eine geringe Alternanz vorhanden.

### 4.1.2 Charakterisierung der Zustände von *all-trans*-Retinal in der ChR-Standard-Protonierung

#### 4.1.2.1 CASPT2 und DFT/MRCI nach HF-Geometrieoptimierung

Tabelle 4-1 fasst die SS/MS-Konfigurationen der beschriebenen Zustände zusammen. Auffällig bei den berechneten Zustandsenergien ist, dass sich die Reihenfolge der Zustände innerhalb der verwendeten Methoden CASSCF, SS-CASPT2 und MS-CASPT2 deutlich unterscheidet. So ist z.B. in der CASSCF Beschreibung der mit

#### 4. Ergebnisse

dem hellen  $1B_u$  Zustand der symmetrischen Polyene vergleichbare  $HOMO^i \rightarrow LUMO^k$  Übergang in  $S_3$  zu finden (s. Anhang A 1, Tabelle A 1-2), während dieser in der SS-CASPT2 auf den  $S_2$  Zustand fällt.

**Tabelle 4-1: Konfigurationen\* der mittels SS/MS-CASPT2 beschriebenen Zustände und dazugehörige Gewichte für die FP-, E\_D und MP-Modelle.**

Modell	Zust.	SS-Konfig.	Gewicht [%]	Zust.	MS-Konfig.	Gewicht [%]
FP	S <sub>0</sub>	222222000000	71	S <sub>0</sub>	222222000000	74
		222220200000	27			
	S <sub>1</sub>	22222u0d0000	15	S <sub>1</sub>	22222ud00000	59
		22222u2d00000	14			
	S <sub>3</sub>	22222ud00000	20	S <sub>2</sub>	222220200000	25
		222220ud0000	13		22222u2d00000	16
		22222u00d000	11			
		222u22d00000	10			
	S <sub>2</sub>	22222ud00000	42	S <sub>3</sub>	222u22d00000	19
			2222ud200000		16	
S <sub>4</sub>	22u222d00000	20	S <sub>4</sub>	22u222d00000	20	
E_D	S <sub>0</sub>	222222000000	71	S <sub>0</sub>	222222000000	74
		222220200000	26			
	S <sub>1</sub>	22222u0d0000	15	S <sub>1</sub>	22222ud00000	59
		22222u2d00000	14			
	S <sub>2</sub>	22222ud00000	33	S <sub>2</sub>	222220200000	26
		222220ud0000	11		22222u2d00000	16
	S <sub>3</sub>	22222ud00000	26	S <sub>3</sub>	222u22d00000	19
		222u22d00000	13		2222ud200000	15
					222220ud0000	10
	S <sub>4</sub>	22u222d00000	21	S <sub>4</sub>	22u222d00000	20
MP	S <sub>0</sub>	222222000000	71	S <sub>0</sub>	222222000000	74
		222220200000	27			
	S <sub>1</sub>	22222u2d00000	14	S <sub>1</sub>	22222ud00000	59
		22222u0d0000	15			
	S <sub>3</sub>	22222ud00000	18	S <sub>2</sub>	222220200000	24
		222220ud0000	13		22222u2d00000	16
		222u22d00000	11			
		22222u00d000	11			
	S <sub>2</sub>	22222ud00000	44	S <sub>3</sub>	222u22d00000	18
		2222ud200000	11		2222ud200000	16
S <sub>4</sub>	22u222d00000	20	S <sub>4</sub>	22u222d00000	19	

\*\*Zahl 2 entspricht einem doppelbesetzten Orbital. u und d bezeichnen eine Einfachbesetzung mit jeweils *spin up* bzw. *spin down*.

MS-CASPT2 wiederum berechnet  $S_1$  als hellen  $1B_u$  Zustand. Die CASSCF-Anregungsenergien sind erheblich höher als der experimentelle Wert. Der Unterschied beträgt mehr als 1.7 eV. Aus diesem Grund wird auf die Anregungsenergien

<sup>j</sup> Highest Occupied Molecular Orbital

<sup>k</sup> Lowest Unoccupied Molecular Orbital

## 4. Ergebnisse

auf CASSCF Niveau an dieser Stelle nicht weiter eingegangen. Die entsprechenden Werte finden sich im Anhang A 1 (Tabelle A 1-2).

Die Grundzustände (GZ) aller berechneten Modelle werden zu über 70% von der geschlossenschaligen HF-Konfiguration bestimmt. Dies geht aus Tabelle 4-1 hervor und gilt sowohl für SS- als auch für MS-CASPT2. Abbildung 4-8 zeigt die mit beiden Methoden berechneten Anregungsenergien und Oszillatorenstärken für **FP**-, **E\_D**- und **MP**-Modelle der HF-optimierten Struktur in Standard-Protonierung. Der experimentelle Wert für die maximale Anregungsenergie von C1C2 ist mit einer gestrichelten Linie gekennzeichnet. Diese beträgt 2.64 eV ( $\lambda_{max} = 470$  nm). Abbildung 4-8 und Tabelle 4-1 lassen erkennen, dass sich die mit SS-CASPT2 berechneten Anregungsenergien deutlich in Lage und Charakter von den MS-CASPT2 berechneten Werten unterscheiden. In der SS-CASPT2 Beschreibung liegen außerdem die Zustände  $S_1$ - $S_3$  näher beieinander als in MS-CASPT2. Alle angeregten Zustände haben einen starken multikonfiguralen Charakter. Die Konfiguration des  $S_1$  Zustandes besteht in allen SS-Modellen hauptsächlich aus den Anteilen der HOMO $\rightarrow$ LUMO (26% - 27%) Doppelanregung und zu etwa gleichen Anteilen aus der HOMO $\rightarrow$ LUMO+1 und der HOMO-1 $\rightarrow$ LUMO (15%) Einfachanregung. Analog zu den Symmetriebezeichnungen bei symmetrischen Polyenen wird dieser Zustand hier als  $2A_g$  bezeichnet. Für die **FP**- und **MP**-Modelle ist der  $S_0 \rightarrow S_1$  Übergang stark verboten bzw. für das **E\_D**-Modell ist er schwach erlaubt. Im Gegensatz dazu ist der  $S_0 \rightarrow S_2$  Übergang mit einem hohen Anteil der HOMO $\rightarrow$ LUMO Einfachanregung (44% - 33%) bei allen SS-Modellen stark erlaubt ( $f = 0.87$ - $1.39$ ). Dieser Zustand entspricht, wie erwähnt, dem  $1B_u$  Zustand in den symmetrischen Polyenen. Durch einen nicht zu vernachlässigbaren Anteil der HOMO $\rightarrow$ LUMO Einfachanregung (18%-26%) ist der  $S_0 \rightarrow S_3$  Übergang ebenfalls optisch hell ( $f = 0.43$ - $0.83$ ) und damit stark erlaubt. Im Absorptionsspektrum würde der  $1B_u$  Zustand einem Maximum entsprechen. Jedoch weicht seine Anregungsenergie ca. 1.21 eV vom experimentellen Maximum ab. Folglich kann mit SS-CASPT2 die Anregung des Retinals nicht optimal beschrieben werden. Der  $S_0 \rightarrow S_4$  Übergang ist bei SS-CASPT2 für alle Modelle verboten und hat eine HOMO-3 $\rightarrow$ LUMO Einfachanregung als führende Konfiguration (19%-20%).

#### 4. Ergebnisse

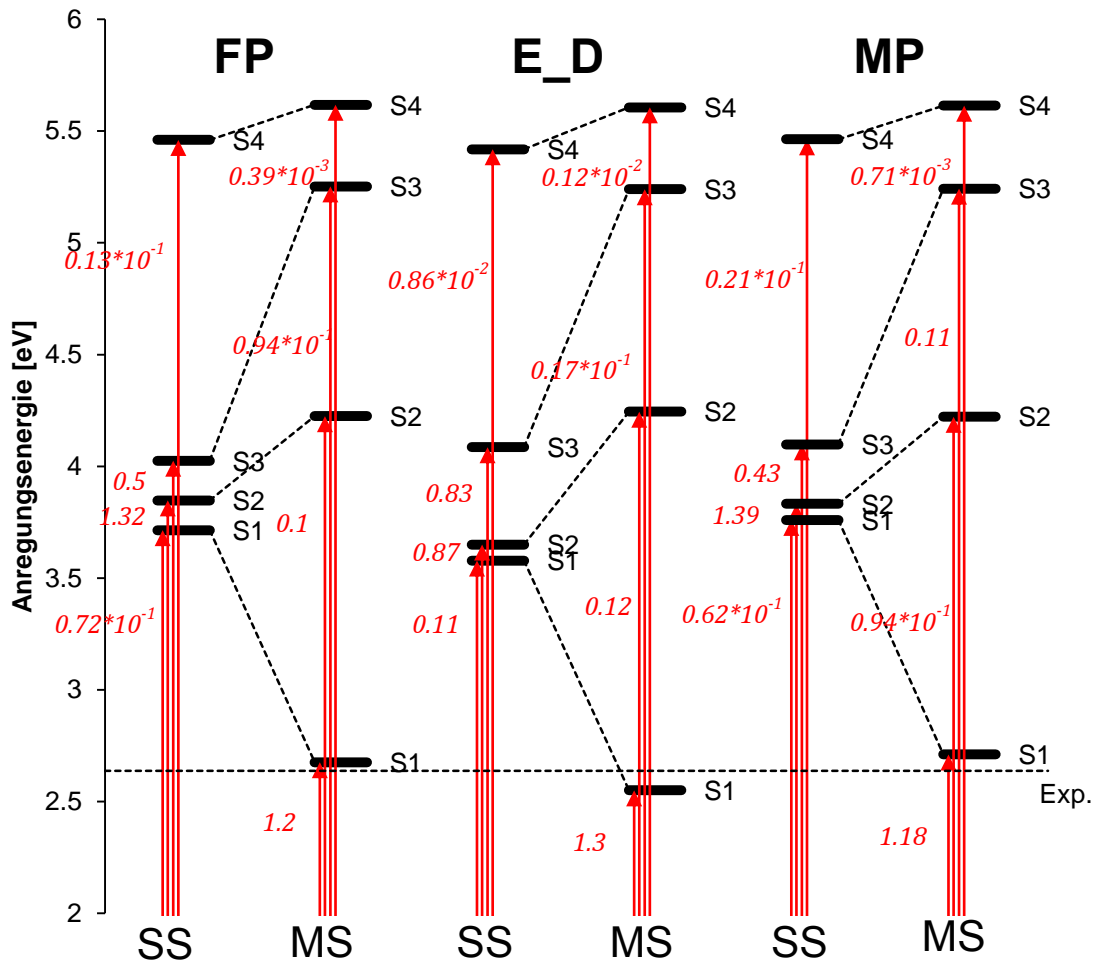


Abbildung 4-8: Anregungsenergien [eV] und Oszillatorenstärken (rot) für die vertikale  $S_0$ - $S_n$  Anregung der HF-optimierten Struktur. Dargestellt sind *single-state* (SS)- und *multi-state* (MS)-CASPT2 Werte für FP-, E\_D- und MP-Modelle. Mit gestrichelter Linie ist der experimentelle Wert 2.64 eV (Exp.) eingezeichnet.

MS-CASPT2 Anregungsenergien und Oszillatorenstärken für den  $1B_u$  Zustand aller untersuchten Modelle sind in guter Übereinstimmung mit den experimentellen Werten. Dieser Zustand entspricht einem  $S_0 \rightarrow S_1$  Übergang mit 59% HOMO  $\rightarrow$  LUMO Einfachanregung und ist optisch hell, also stark erlaubt. Die größte Abweichung vom experimentellen Wert wurde für das E\_D-Modell mit nur -0.089 eV festgestellt. Der schwach erlaubte  $S_0 \rightarrow S_2$  Übergang entspricht für alle MS-Modelle dem  $2A_g$  Zustand. Der schwach erlaubte  $S_0 \rightarrow S_3$  Übergang wird bei allen MS-Modellen hauptsächlich durch HOMO-2  $\rightarrow$  LUMO Einfachanregung und die HOMO-1, HOMO  $\rightarrow$  LUMO<sup>2</sup> Doppelanregung charakterisiert. Im E\_D-Modell hat zusätzlich die HOMO<sup>2</sup>  $\rightarrow$  LUMO, LUMO+1 Konfiguration einen nicht zu vernachlässigenden Anteil (10%). Der Übergang in den  $S_4$  Zustand ist wie im SS Modell verboten und hat die HOMO-3  $\rightarrow$  LUMO Einfachanregung als führende Konfiguration.

## 4. Ergebnisse

Die Anregung des Retinals im Channelrhodopsin wird mit SS-CASPT2 und MS-CASPT2 sehr unterschiedlich beschrieben. Mit MS-CASPT2 konnte für die HF-optimierte Geometrie eine bessere experimentelle Übereinstimmung bezüglich der maximalen Absorption erreicht werden.

Zusätzlich zu den SS/MS-CASPT2-Berechnungen wurden für die jeweiligen Modelle DFT/MRCI-Berechnungen durchgeführt. Die Werte für Anregungsenergien, absolute Energien, dazugehörige Konfigurationen und Gewichte für alle Modelle sind in Tabelle 4-2 zusammengefasst.

**Tabelle 4-2: Berechnete DFT/MRCI Energien\*, zugeordnete Zustände, entsprechende Konfigurationen mit den dazugehörigen Wichtungen und Oszillatorenstärken.**

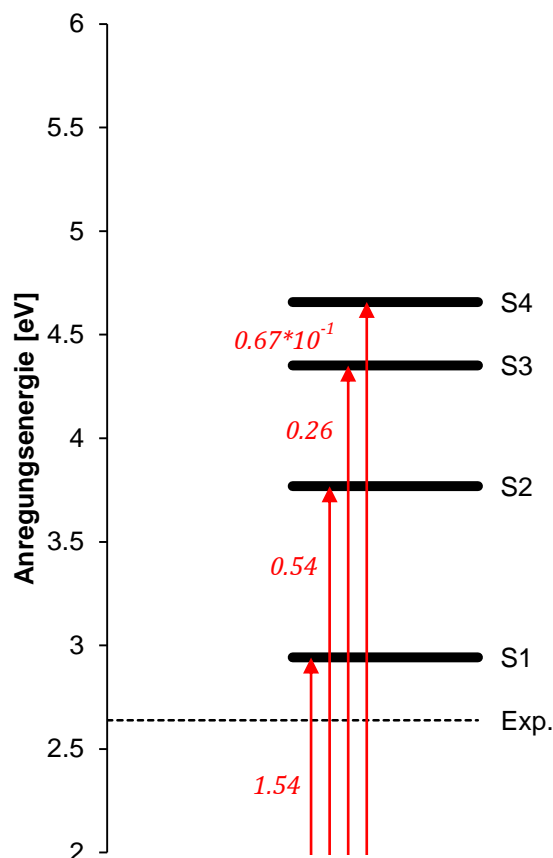
Modell	Zustand	E	E <sub>abs.</sub>	Konfiguration	Gewicht [%]	f
<b>FP</b>	S <sub>0</sub>	-872.953673	-872.953673	GZ	94	-
	S <sub>1</sub>	2.9415 (422)	-872.845576	H→L	83	1.54
	S <sub>2</sub>	3.7681 (329)	-872.815200	H-1→L	39	0.54
				H→L+1	11	
	S <sub>3</sub>	4.3511 (285)	-872.793773	H→L+1	31	0.26
H-1→L				18		
S <sub>4</sub>	4.6581 (266)	-872.782493	H-2→L	29	0.067	
			H→L+1	22		
<b>E_D</b>	S <sub>0</sub>	-872.942822	-872.942822	GZ	94	-
	S <sub>1</sub>	2.8338 (438)	-872.838683	H→L	84	1.52
	S <sub>2</sub>	3.7218 (333)	-872.806049	H-1→L	43	0.51
	S <sub>3</sub>	4.3085 (287)	-872.784488	H→L+1	31	0.27
				H-1→L	17	
S <sub>4</sub>	4.6249 (268)	-872.772860	H-2→L	29	0.074	
			H→L+1	21		
<b>MP</b>	S <sub>0</sub>	-872.951768	-872.951768	GZ	94	-
	S <sub>1</sub>	2.9853 (415)	-872.842060	H→L	83	1.53
	S <sub>2</sub>	3.7851 (328)	-872.812670	H-1→L	38	0.54
				H→L+1	13	
	S <sub>3</sub>	4.3604 (284)	-872.791525	H→L+1	35	0.27
H-1→L				19		
S <sub>4</sub>	4.6651 (266)	-872.780331	H-2→L	32	0.053	
				H→L+1	18	

\*Energien für S<sub>0</sub> Zustände und absolute Energien (E<sub>abs.</sub>) in Hartree, für S<sub>1</sub>-S<sub>4</sub> Zustände relative Energien in eV und nm (in Klammern).

Da sich die Ergebnisse für verschiedene Modelle hauptsächlich durch die S<sub>0</sub>→S<sub>1</sub> Anregungsenergien unterscheiden, werden hier die Ergebnisse der DFT/MRCI-Berechnungen anhand des **FP**-Modells diskutiert.

## 4. Ergebnisse

Abbildung 4-9 zeigt die mit DFT/MRCI berechneten Anregungsenergien und Oszillatorenstärken für das **FP-Modell** der HF-optimierten Struktur in Standard-Protonierung.



**Abbildung 4-9:** DFT/MRCI-Anregungsenergien für das FP-Modell der HF-optimierten Geometrie in Standard-Protonierung. Der experimentelle Wert ist mit einer gestrichelten Linie gekennzeichnet (2.64 eV).

Der Grundzustand wird zu 94% durch die geschlossenschalige HF-Konfiguration dominiert. Im Vergleich zu SS/MS-CASPT2 ist der Anteil der DFT/MRCI HF-Konfiguration höher, d.h. es zeigt sich weniger Konfigurationsmischung. Der optisch helle ( $f=1.54$ ) S<sub>1</sub> Zustand hat 1B<sub>u</sub> Charakter (84%). Der optisch helle ( $f=0.54$ ) S<sub>2</sub> Zustand wird hauptsächlich durch HOMO-1→LUMO (43%) Einfachanregung charakterisiert. Der Anteil der HOMO→LUMO+1 Einfachanregung beträgt (13%). Die für den 2A<sub>g</sub> Zustand charakteristische HOMO<sup>2</sup>→LUMO<sup>2</sup> Doppelanregung trägt mit 7% nur geringfügig zum Charakter des S<sub>2</sub> Zustandes bei. Dominierend beim optisch hellen S<sub>3</sub> Zustand sind HOMO→LUMO+1 (35%) und HOMO-1→LUMO (19%) Einfachanregungen. Zu der Wellenfunktion des optisch dunklen S<sub>4</sub> Zustandes tragen zum größten Teil HOMO-2→LUMO (32%) und HOMO→LUMO+1 (22%) Einfachanregungen bei. Die relative Lage der Zustände in DFT/MRCI ist mit der der MS-CASPT2 Energieniveaus vergleichbar. Die aus der DFT/MRCI-Rechnung resultierenden Anregungs-

## 4. Ergebnisse

energien sind für alle angeregten Zustände bis auf  $S_1$  im Vergleich zu MS-CASPT2 kleiner. Die Lage des  $S_1$  Zustandes ist bei DFT/MRCI höher.

In Tabelle A 1-1 (Anhang A 1) sind absolute Energien für HF-optimierte Strukturen aufgeführt. Tabelle A 1-2 (Anhang A 1) fasst CASSCF- und SS/MS-CASPT2-Energien des Grundzustands und der angeregten Zustände sowie dazugehörige Oszillatorenstärken zusammen.

### **4.1.2.2 CASPT2 und DFT-MRCI nach DFT/B3LYP-Geometrieoptimierung**

Im Vergleich zur HF-optimierten Geometrie änderten sich in dieser Berechnung sowohl die Zustandsenergien als auch der Charakter der Anregungen signifikant. Abbildung 4-10 zeigt die Anregungsenergien, die mit SS/MS-CASPT2 und DFT/MRCI für die DFT/B3LYP optimierte Retinalstruktur berechnet wurden. Da die Ergebnisse für **FP**-, **E\_D**- und **MP**-Modelle sich nur geringfügig unterscheiden, werden in Abbildung 4-10 die Ergebnisse exemplarisch für das **FP**-Modell dargestellt. Ergebnisse für alle Modelle sind in der Tabelle A 1-4 für CASPT2 und Tabelle A 1-6 für DFT/MRCI im Anhang A 1 zusammengefasst. Da die Änderungen zum größten Teil den Grundzustand und die ersten zwei angeregten Zustände betreffen ( $S_1$  und  $S_2$ ), werden im Folgenden nur diese ausführlich beschrieben. Die Lage der restlichen Zustände sowie die entsprechenden Oszillatorenstärken sind in den Abbildungen dargestellt.

Die SS-CASPT2 Grundzustandsfunktion wird zu 65% durch die geschlossenschalige HF-Konfiguration dominiert. Anders als in den zuvor betrachteten Modellen entspricht der optisch helle  $1B_u$  Zustand in der SS-CASPT2 Beschreibung dem  $S_1$  Zustand, mit 57% HOMO $\rightarrow$ LUMO Einfachanregung. Dem  $S_0\rightarrow S_2$  ( $f=0.12\cdot 10^{-3}$ ) Übergang kann  $2A_g$  Charakter zugeordnet werden. Bis auf den  $S_0\rightarrow S_1$  Übergang sind alle weiteren Übergänge verboten.

## 4. Ergebnisse

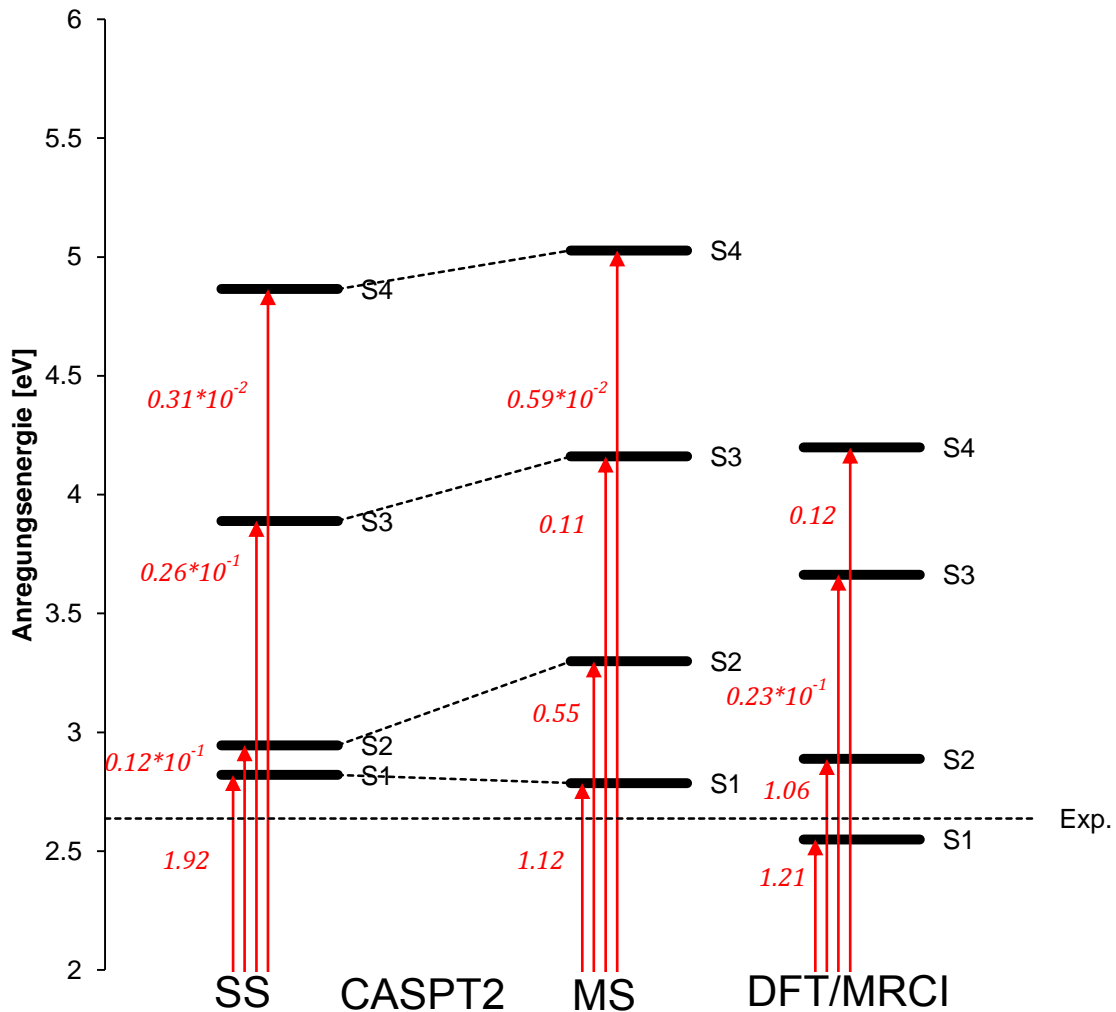


Abbildung 4-10: Anregungsenergien für das FP-Modell der DFT/B3LYP-optimierten Geometrie. Ergebnisse der SS/MS-CASPT2 und DFT/MRCI-Rechnungen. Eingezeichnet sind Oszillatorenstärken (rot) und der experimentelle Wert von 2.64 eV (gestrichelte Linie)

Den höchsten Anteil bei der MS-CASPT2 Grundzustandsfunktion hat die geschlossenschalige HF-Konfiguration (72%). Danach folgt der optisch helle  $1B_u$  Zustand ( $f=1.12$ ). Der  $S_0 \rightarrow S_2$  Übergang ist aufgrund eines nicht zu vernachlässigenden HOMO $\rightarrow$ LUMO Anteils (23%) ebenfalls optisch hell ( $f=0.55$ ). Seine Wellenfunktion setzt sich zusätzlich aus Beiträgen der HOMO $^2 \rightarrow$ LUMO $^2$  (17%) Doppelanregung und HOMO-1 $\rightarrow$ LUMO (12%) Einfachanregung zusammen und trägt somit einen gemischten HOMO $\rightarrow$ LUMO Einfach- und Doppelanregungscharakter. Der  $S_0 \rightarrow S_3$  Übergang ist schwach erlaubt ( $f=0.11$ ). Bis auf  $S_4$  sind somit in der MS-CASPT2-Beschreibung alle Zustände optisch hell.

Die mit DFT/MRCI berechnete Wellenfunktion für den Grundzustand wird fast ausschließlich (91%) durch die geschlossenschalige HF-Konfiguration bestimmt.  $S_1$  hat  $1B_u$  Charakter mit 62 % HOMO $\rightarrow$ LUMO Einfachanregung. Der  $S_2$  Zustand hat, vergleichbar mit MS-CASPT2, stark gemischten HOMO $\rightarrow$ LUMO Einfach- und Doppel-

## 4. Ergebnisse

anregungscharakter. Die HOMO→LUMO Einfachanregung (16%-24%) trägt zu der hohen Oszillatorenstärke ( $f=0.84-1.06$ ) des  $S_0 \rightarrow S_2$  Übergangs bei.

DFT/MRCI und MS-CASPT2 ordnen den Übergängen in die  $S_1$  und  $S_2$  Zustände jeweils hohe Oszillatorenstärken zu. Auch die Abstände zwischen  $S_1$  und  $S_2$  sind ähnlich, während SS-CASPT2 hier kleinere Abstände, aber auch eine kleine Oszillatorenstärke für  $S_2$  liefert. Im Vergleich zu den HF-Modellen wird der  $2A_g$  Zustand durch die kleinere Bindungsalternanz der DFT/B3LYP-optimierten Grundzustandsstrukturen relativ zum Grundzustand abgesenkt. D.h. der  $S_1$ - $S_2$  Abstand ist bei diesen Strukturen kleiner als bei den entsprechenden HF-Optimierungen. Dies könnte ein Hinweis auf eine Umkehr der Bindungsalternanz im  $2A_g$  Zustand sein. Alle mit DFT/MRCI bestimmten Anregungsenergien sind deutlich niedriger als die berechneten MS-CASPT2 Anregungsenergien. Sowohl MS-CASPT2-, DFT/MRCI- als auch SS-CASPT2  $S_0 \rightarrow S_1$  Anregungsenergien befinden sich in guter Übereinstimmung mit dem experimentellen Wert. Allerdings stellte sich die SS-CASPT2-Methode im Kontext der HF-optimierten Geometrien als unzuverlässig für die Beschreibung der Zustände dar, die damit erhaltenen Ergebnisse sind folglich mit Vorsicht zu interpretieren.

In Tabelle A 1-5 (Anhang A 1) ist der Charakter aller CASPT2- bzw. in Tabelle A 1-6 der DFT/MRCI-Zustände aufgeführt. In Tabelle A 1-3 im Anhang A 1 sind absolute Energien für HF-optimierte Strukturen aufgeführt.

### **4.1.2.3 CASPT2 und DFT-MRCI nach CASSCF-Geometrieoptimierung**

Für die SS-CASPT2-Methode ergaben sich für die Optimierungen in diesem Kapitel ähnlich stark abweichende Resultate wie zuvor für die HF-Berechnungen. Im Folgenden wird deshalb nur auf die mit MS-CASPT2 und DFT-MRCI erhaltenen Ergebnisse eingegangen. Detaillierte Ergebnisse der DFT/MRCI- und CASSCF/CASPT2 Rechnungen für alle Modelle sind in Tabelle A 1-8-Tabelle A 1-10 im Anhang A 1 zusammengefasst.

Der größte Unterschied zwischen den Modellen ist die  $S_0 \rightarrow S_1$  Anregungsenergie. Dieser Unterschied wird näher in Kapitel 4.1.3 diskutiert. Die Zusammensetzung der angeregten Zustände sowie die Oszillatorenstärken sind für alle Modelle annähernd identisch. Aus diesem Grund werden die Anregungsenergien exemplarisch anhand des **FP**-Modells in Abbildung 4-11 diskutiert. Die Grundzustände ergeben sich ähnlich wie zuvor besprochen.

## 4. Ergebnisse

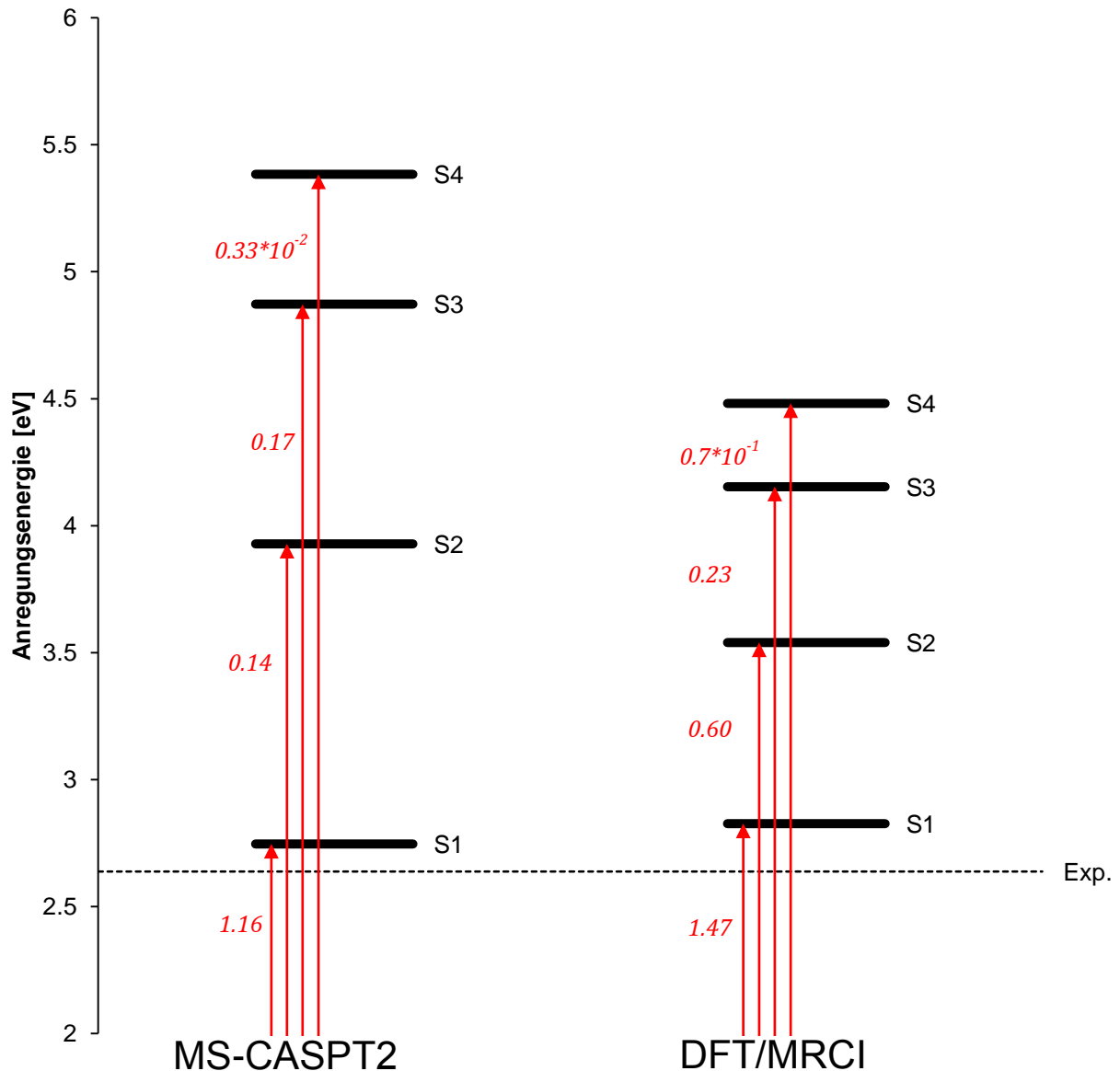


Abbildung 4-11: Anregungsenergien für das FP-Modell der CASSCF-optimierten Geometrie. Ergebnisse der MS-CASPT2 und DFT/MRCI-Rechnungen. Eingezeichnet sind Oszillatorenstärken (rot) und der experimentelle Wert von 2.64 eV (gestrichelte Linie).

Der  $S_0 \rightarrow S_1$  Übergang ist in MS-CASPT2 optisch hell ( $f=1.16$ ),  $S_1$  entspricht dem  $1B_u$  Zustand. Der Übergang nach  $S_2$  ist schwach erlaubt, der Zustand hat  $2A_g$  Charakter. Alle Anregungen bis auf den  $S_0 \rightarrow S_4$  Übergang sind optisch hell.

In DFT-MRCI erhält der  $1B_u$  Zustand ( $S_1$ ) eine hohe Oszillatorenstärke ( $f=1.47$ ). Der ebenfalls erlaubte  $S_0 \rightarrow S_2$  Übergang ( $f=0.61$ ) setzt sich hauptsächlich aus den Anteilen der  $HOMO-1 \rightarrow LUMO$  (34%) und  $HOMO \rightarrow LUMO+1$  (12%) Einfachanregungen zusammen. Der Anteil der  $HOMO^2 \rightarrow LUMO^2$  Doppelanregung ist mit 7% wesentlich geringer als für den MS-CASPT2  $2A_g$  Zustand. Auch hier sind alle Übergänge bis auf die  $S_0 \rightarrow S_4$  Anregung erlaubt.

## 4. Ergebnisse

DFT/MRCI berechnet höhere  $S_0 \rightarrow S_1$  Anregungsenergien, während alle anderen Werte gegenüber MS-CASPT2 erniedrigt sind.

Der Abstand zwischen den  $S_1$  und  $S_2$  Zuständen ist mit dem der HF-optimierten Modelle vergleichbar, er ist größer als in den DFT/B3LYP optimierten Strukturen.

In Tabelle A 1-7 im Anhang A 1 sind absolute CASSCF/CASPT2 Energien für alle Modelle zusammengefasst.

### 4.1.3 Vergleich der Anregungsenergien des $1B_u$ Zustands

Abbildung 4-12 stellt die mit DFT-MRCI und MS-CASPT2 berechneten  $S_0 \rightarrow S_1$  Anregungsenergien der **FP**-, **E\_D**- und **MP**-Modelle (von links nach rechts) gegenüber. Es wird deutlich, dass die Ergebnisse, je nach Wahl der Optimierungsmethode und Mobilität der Umgebung variieren. Die maximale Abweichung beträgt +0.35 eV (**MP**, DFT/MRCI). Die minimale Abweichung ergibt sich aus der HF-Berechnung des **FP**-Modells zu ca. 0.05 eV, d. h. die berechneten Werte stehen größtenteils in guter Übereinstimmung mit dem Experiment.

Das **E\_D**-Modell besitzt innerhalb der gleichen Optimierungsmethode stets die niedrigste Anregungsenergie, während die Anregungsenergien der **FP**- und **MP**-Modelle ähnliche Werte aufweisen. Diese Tendenz lässt sich vor allem auf die Position der Gegenionen bzw. ihren Abstand zur Retinal-Schiff-Base zurückführen. Im **E\_D**-Modell ergibt sich der größte Abstand des Glu162-OE1 zum positiv geladenen Schiff-Base-Terminus (s. Kapitel 4.1.1). Durch die größere Entfernung der negativen Ladung wird der Grundzustand destabilisiert, der  $1B_u$  Zustand entsprechend stabilisiert. Dies führt zu einer niedrigeren Anregungsenergie. Im **MP**-Modell kehrt der entsprechende OE1 Sauerstoff fast an die ursprüngliche Position der Kristallstruktur zurück, d.h. er rückt wieder näher an den Schiff-Base-Terminus und stabilisiert somit den Grundzustand.

Die mit DFT/MRCI berechneten Anregungsenergien folgen innerhalb der jeweiligen Modelle stets dem gleichen Trend, dies wird in Abbildung 4-12 deutlich: Die höchste Anregungsenergie wird mit HF erhalten, die niedrigste mit DFT, in der Mitte liegt stets CASSCF. Dies spiegelt die Unterschiede in der Bindungsalternanz zwischen den verschiedenen Optimierungsmethoden wider. Die HF-Methode ergibt die größte Bindungsalternanz, DFT die kleinste, CASSCF liegt entsprechend dazwischen. Je höher die Bindungsalternanz, desto größer wird der Abstand zwischen  $S_1$  und  $S_0$ .

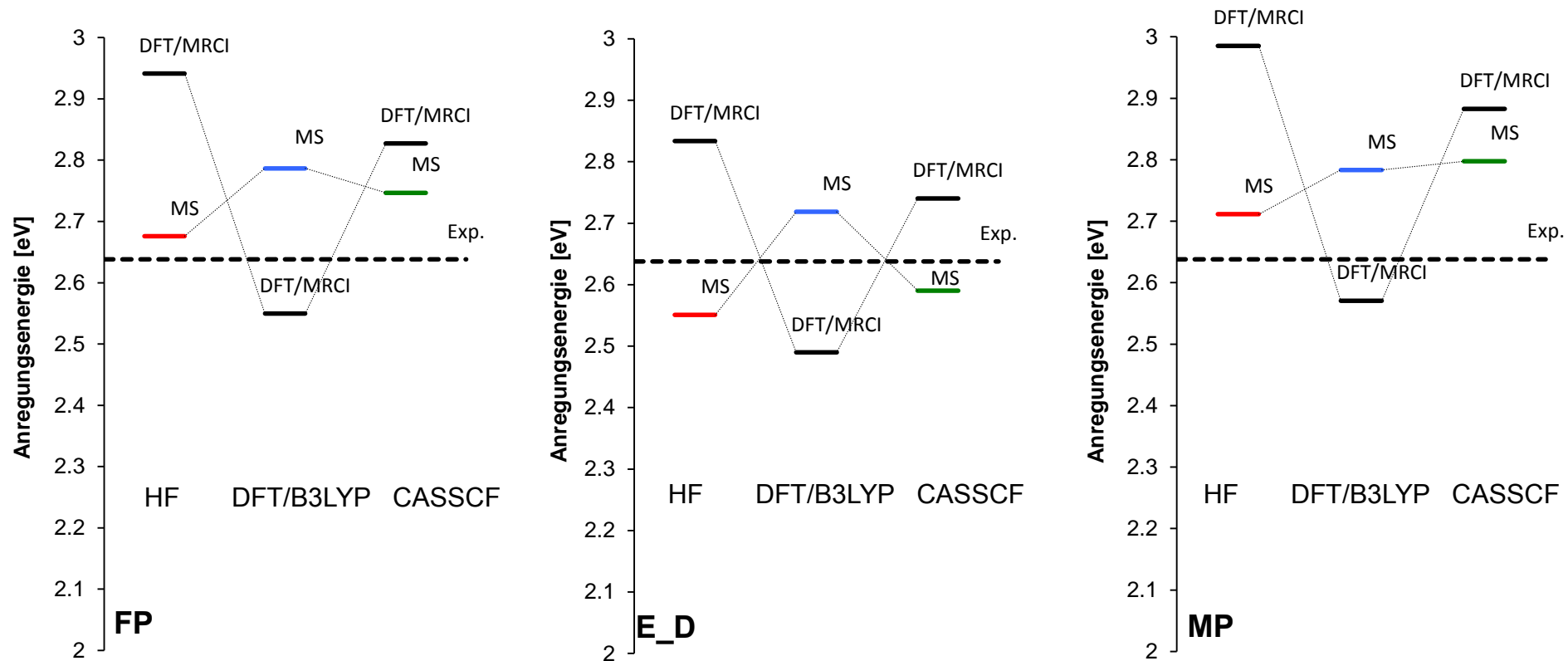


Abbildung 4-12: MS-CASPT2 und DFT/MRCI Anregungsenergien des  $1B_u$  Zustands für HF- (rot), DFT/B3LYP (blau) und CASSCF (grün)-optimierten FP-, E\_D- und MP-Modelle. Von links nach rechts: FP-, E\_D- und MP-Modell.

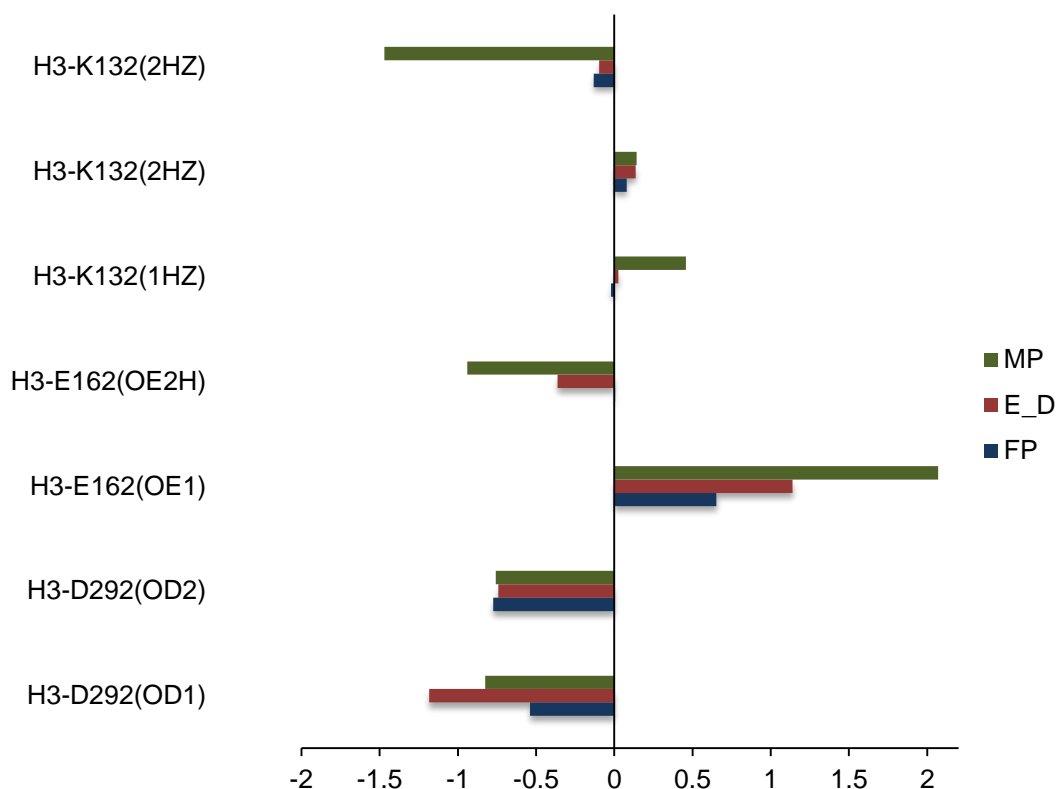
## 4. Ergebnisse

Die Ergebnisse der MS-CASPT2-Rechnungen entsprechen nicht diesem Schema. Die HF-Geometrien geben hier die kleinsten Werte wieder, DFT zumeist die höchsten, und CASSCF liegt dazwischen. Lediglich bei der **MP**-Struktur ist die Anregungsenergie der CASSCF-Geometrie leicht erhöht gegenüber der DFT-Optimierung (Abbildung 4-12 rechts). Um diese Beobachtung näher zu untersuchen, wurde die Zusammensetzung der Wellenfunktion für die DFT/B3LYP bzw. CASSCF-Optimierungen analysiert. Zusätzlich wurden die Anregungsenergien für jede Optimierungsmethode nochmals ohne Punktladungen, d.h. im Vakuum, berechnet. Beim Betrachten der MS-CASPT2 Kopplungsmatrizen im Ladungsfeld wurde festgestellt, dass gegenüber den Vakuumberechnungen starke Kopplungen im  $S_1$  und  $S_2$  Zustand mit anderen Zuständen auftreten. Dies führt zu einer starken Aufspaltung dieser Zustände gegenüber den SS-CASPT2 Berechnungen, während Vakuumberechnungen annähernd gleiche Ergebnisse in SS- und MS-CASPT2 liefern. Die Ergebnisse der Vakuum-Berechnungen sind in Tabelle A 1-11 im Anhang A 1 dargestellt. Ohne Ladungsfeld zeigen sich ähnliche Trends wie zuvor bei der DFT/MRCI-Berechnung: Die DFT Struktur ergibt die niedrigsten Anregungsenergien, CASSCF die zweitniedrigsten und die HF-Geometrie die höchsten Werte. Diese Feststellungen liefern einen Hinweis darauf, dass die Wechselwirkungen mit der Umgebung die MS-CASPT2 Absorption so stark beeinflussen, dass der Einfluss der Bindungsalternanz untergeht.

### 4.1.4 QM/MM-Geometrieoptimierung-GLH162-Struktur

Im Folgenden werden die Ergebnisse des protonierten GLH162 Modells diskutiert. Ähnlich zur Standard-Protonierung nähert sich die Schiff-Base in der GLH162-Struktur während der Geometrieoptimierungen dem Gegenion Asp292 (s. Kapitel 4.1.1), wobei diese Tendenz unabhängig vom Optimierungsverfahren bei allen Modellen beobachtet wird. Analog zu den Ergebnissen aus Kapitel 4.1.1 wurden die Abstände zwischen der Schiff-Base, den Gegenionen und dem Lysinrest gemessen. Bis auf das **MP**-Modell der jeweiligen HF- bzw. CASSCF-optimierten Geometrien, weisen die HF-, DFT/B3LYP- und CASSCF-Geometrien keine signifikanten Unterschiede auf. Abbildung 4-13 zeigt exemplarisch für die HF-optimierten **FP**-, **E\_D**- und **MP**-Modelle die Differenz der jeweiligen Abstände zur Kristallstruktur. Ergebnisse für die DFT/B3LYP- und CASSCF-optimierte Geometrien befinden sich im Anhang A 2 (Abbildung A 2-1).

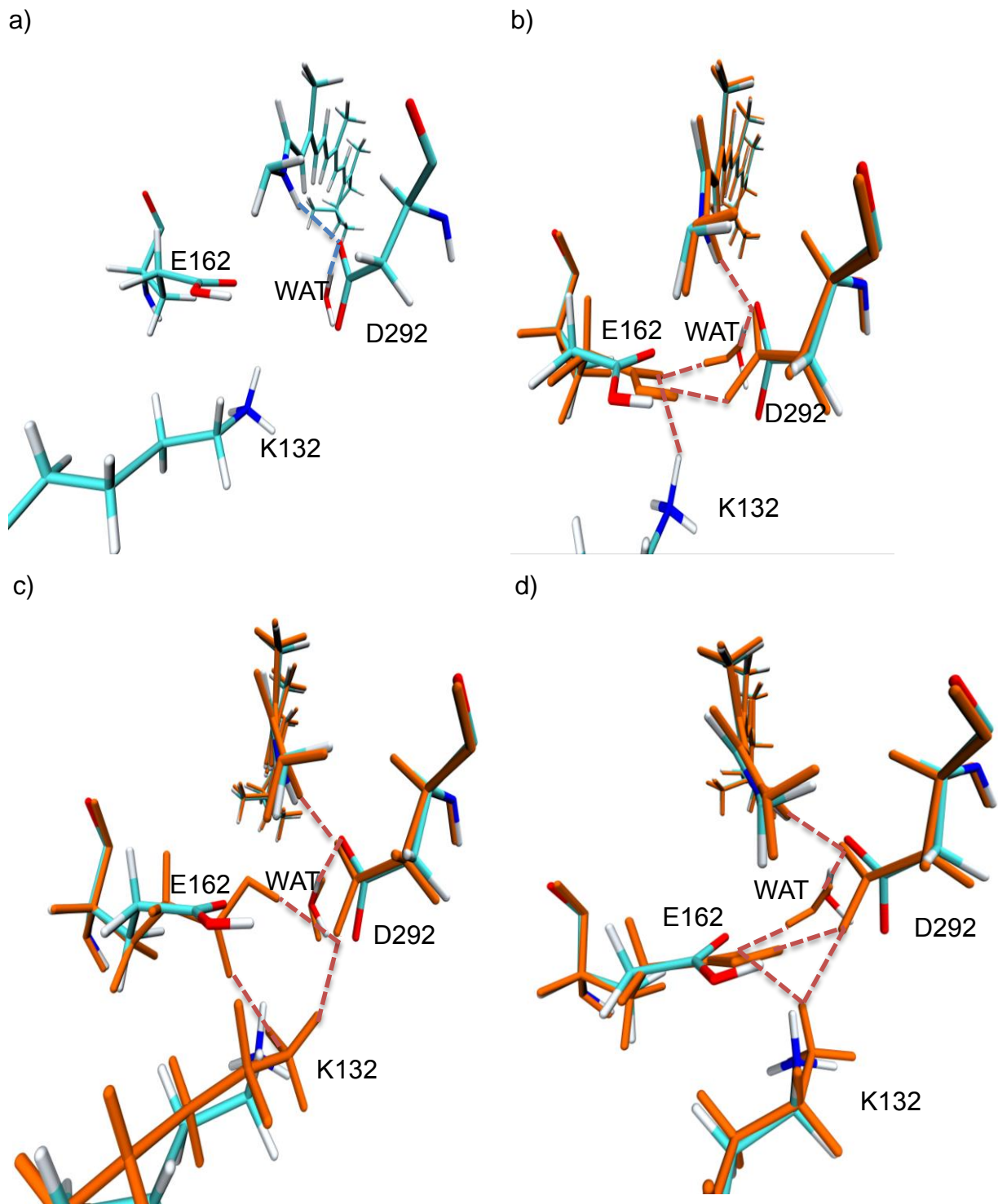
#### 4. Ergebnisse



**Abbildung 4-13:** Vergleich der Abstandsänderung für FP- (blau), E\_D- (braun) und MP-Modelle im Rahmen der HF-Geometrieoptimierung der GLH162-Struktur. Aufgetragen wurden Abstandsänderungen in [Å] relativ zu den Abständen in der Kristallstruktur. Die Abstände entsprechen der Darstellung in Abbildung 4-2.

In allen Modellen verringert sich der Abstand zum negativ geladenen Asp292. Die größte Änderung ist im **E\_D**-Modell zu verzeichnen ( $> 1$  Å). Gleichzeitig vergrößert sich der Abstand zum Carbonylsauerstoff des anderen Gegenions (E162), während sich der Abstand zu seinem Carboxylwasserstoff in den **E\_D**- und **MP**-Modellen verringert. Das Glu162 führt eine Kippbewegung parallel zu D292 aus, die im **MP**-Modell maximal wird. In Abbildung 4-14 b)-c) wird diese Bewegung verdeutlicht. Gleichzeitig ist diese Änderung im HF-**MP**-Modell in Bezug auf die **MP**-Modelle der DFT/B3LYP- und CASSCF-optimierten Strukturen maximal. Des Weiteren zeigt sich, dass sich im **MP**-Modell der Abstand nur zu einem der Wasserstoffatome des Lysins deutlich verkürzt ist (ca. 1.5 Å). Für das **MP**-Modell der CASSCF-optimierten Struktur fällt diese Änderung eher gering aus. In Abbildung 4-14 wird die HF-optimierte **FP** Struktur (a) mit den **E\_D**- (b)- und **MP**- (c)-Modellen zum Vergleich überlagert. In allen **E\_D**-Modellen bilden sich, verglichen mit dem **FP**-Modell, mehr Wasserstoffbrücken aus.

## 4. Ergebnisse



**Abbildung 4-14: GLH162-Geometrieoptimierung.** a) HF-optimierte FP Struktur, b)-c) Überlagerung der HF-optimierten FP-Struktur (türkis) mit den Strukturen der E\_D- und MP-Modelle (orange), d) Überlagerung der CASSCF-optimierten FP-Struktur mit der Struktur des MP-Modells.

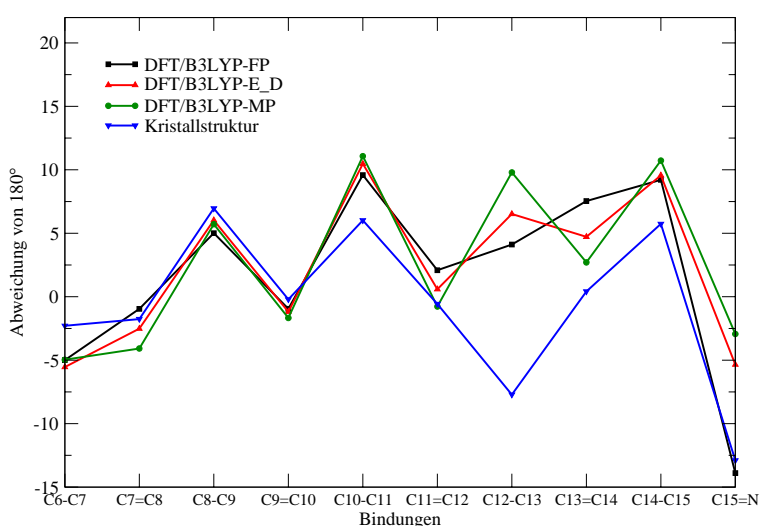
Diese entstehen zwischen dem Proton der Schiff-Base, dem benachbarten Wassermolekül, den beiden Gegenionen und dem Wasserstoffatom des Lysins. In den MP-

## 4. Ergebnisse

Modellen führt die Bewegung des Lysins zur Ausbildung zusätzlicher Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Lysin und D292. Bis auf das HF-optimierte **MP**-Modell unterscheiden sich die Geometrieänderungen in CASSCF und DFT/B3LYP **MP**-Modellen von den **E\_D**-Modellen hauptsächlich durch diese zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung. Um dies zu verdeutlichen, sind in Abbildung 4-14 (d) die **FP**- und **MP**-Modelle der CASSCF-optimierten Geometrie überlagert. Im HF-optimierten **MP**-Modell richtet sich E162 nahezu parallel zu D292 (Abbildung 4-14 c) aus.

Die Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Lysin und den beiden Gegenionen in **MP**-Modellen ist mit der Beobachtung in der Standard-Protonierung vergleichbar. Die Position des Wassermoleküls ändert sich im Gegensatz zur Standard-Protonierung während der Optimierungen in allen **E\_D**- und **MP**-Modellen bis auf das HF-**MP**-Modell.

Analog zur Standard-Protonierung wurde in der GLH162-Struktur die Veränderung der Diederwinkel verfolgt. Bis auf die Torsion um die C15=N Bindung zeigen die HF- und CASSCF-optimierten Modelle einen nahezu ähnlichen Verlauf (s. Anhang A 2, Abbildung A 2-2). Bei dem HF-**MP** Modell zeigt sich im Gegensatz zu anderen Strukturen ein Wechsel der Torsionsrichtung bei der C15=N Bindung. Bei den DFT/B3LYP-optimierten Strukturen weicht das **FP**-Modell von **E\_D**- bzw. **MP**-Modell deutlich ab (Abbildung 4-15).



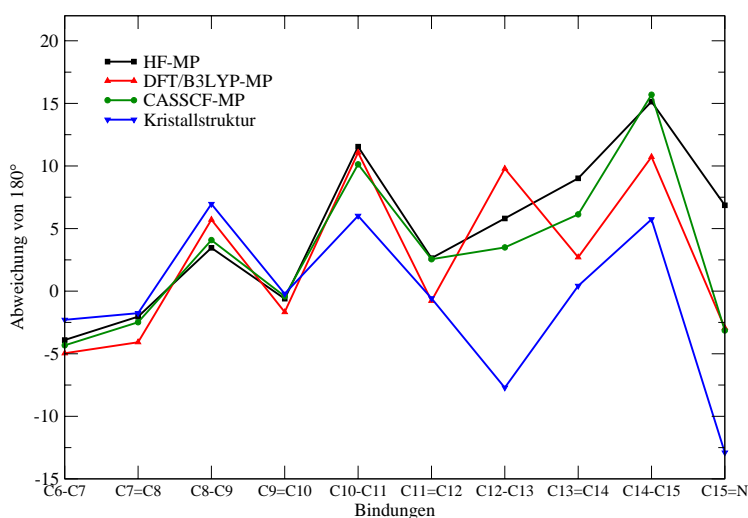
**Abbildung 4-15: Diederwinkelanalyse für DFT/B3LYP-optimierte FP-, E\_D- und MP-Modelle.**

Alle Strukturen zeigen eine signifikante Abweichung von der Kristallstruktur bei der Torsion um die C12-C13 Bindung. Während die **E\_D**- und **MP**-Modelle ab der Torsion um C7=C8 Bindung ein durchgehend alternierendes Verhalten zeigen, wird diese

## 4. Ergebnisse

Alternanz bei dem **FP**-Modell im Bereich der C12-C13 bzw. C13=C14 Bindung unterbrochen. Ein ähnlicher Trend resultiert aus dem Vergleich der Optimierungsmethoden bezogen auf das **MP**- (Abbildung 4-16 a) bzw. **E\_D**-Modell (s. Anhang A 2, Abbildung A 2-3), wobei diese nur bei der DFT/B3LYP-Optimierung eine durchgehende Alternanz zeigen. Im Gegensatz dazu wird bei unterschiedlich optimierten **FP**-Modellen (Abbildung 4-16 b) unabhängig von der Methode keine alternierende Abweichung bezüglich der Torsion um C12-C13 bzw. C13=C14 Bindungen beobachtet.

a)



b)

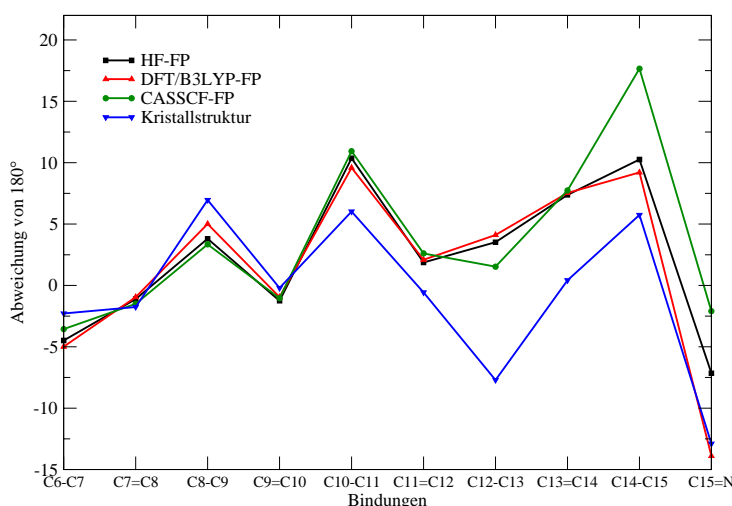


Abbildung 4-16: Diederwinkelanalyse für a) MP-Modelle und b) FP-Modelle nach jeweils HF-, DFT/B3LYP- und CASSCF-Optimierungen.

Dieses Ergebnis ist mit unterschiedlich optimierten **FP**-, **E\_D**- und **MP**-Modellen der Standard-Protonierung (s. Abbildung 4-7) vergleichbar, wobei bei dem DFT/B3LYP-**MP**-Modell die Alternanz erst bei der C13=C14 Bindung verloren geht.

## 4. Ergebnisse

Alle optimierten Strukturen zeigen die größte Abweichung zur Kristallstruktur bei der Torsion um die C12-C13 Bindung.

In der GLH162-Struktur wurde relativ zur Standard-Protonierung eine stärkere Abweichung der **FP**-, **E\_D**- und **MP**-Modelle voneinander im Rahmen des jeweiligen Optimierungsverfahrens beobachtet.

### 4.1.5 Charakterisierung der Zustände von *all-trans*-Retinal in der ChR-GLH162-Struktur

Alle Modelle zeigten eine ähnliche Elektronenstruktur, vergleichbare Oszillatorenstärken und nahezu gleiche Zusammensetzung der angeregten Zustände. In Abbildung 4-17 werden beispielhaft MS-CASPT2 und DFT/MRCI Anregungsenergien für das **FP**-Modell und alle Optimierungsverfahren dargestellt. Details der MS-CASPT2 und DFT/MRCI-Berechnungen sind in Tabelle A 2-2, Tabelle A 2-3, Tabelle A 2-5, Tabelle A 2-6, Tabelle A 2-8 und Tabelle A 2-9 für die entsprechenden Optimierungsverfahren im Anhang A 2 zusammengefasst.

Die Ergebnisse erinnern grundsätzlich stark an die der unprotonierten Spezies (Standard-Struktur), es ergeben sich nahezu die gleichen Trends. Die Grundzustandswellenfunktionen in DFT-MRCI zeigen einen höheren Anteil der geschlossenschaligen HF-Konfiguration als in MS-CASPT2 (ca. 90% gegenüber ca. 70%). Der  $1B_u$  Zustand ist in allen Berechnungen  $S_1$  und erfährt die höchste Oszillatorstärke.  $S_2$  hat in MS-CASPT2 bis auf DFT/B3LYP optimierte Strukturen überwiegend  $2A_g$  Charakter und ist bei großer Bindungsalternanz schwach erlaubt, bei geringer Alternanz stark erlaubt. DFT/B3LYP optimierte Modelle zeigen in MS-CASPT2 einen gemischten HOMO→LUMO Doppel- und Einfachanregungscharakter. In DFT/MRCI ist der  $2A_g$  Charakter von  $S_2$  nicht so deutlich ausgeprägt. Ähnlich zur Standard-Protonierung wird der  $2A_g$  Zustand durch die kleinere Bindungsalternanz der DFT/B3LYP-optimierten Grundzustandsstrukturen relativ zum Grundzustand abgesenkt (Abbildung 4-17, mitte).

Obwohl sich die Abstände zwischen dem geladenen Asp292 und der Schiff-Base wesentlich unterscheiden (bis zu 0.7 Å, vgl. Abbildung 4-14), macht sich dies, anders als in der Standardprotonierung, kaum in den Absorptionsenergien bemerkbar.

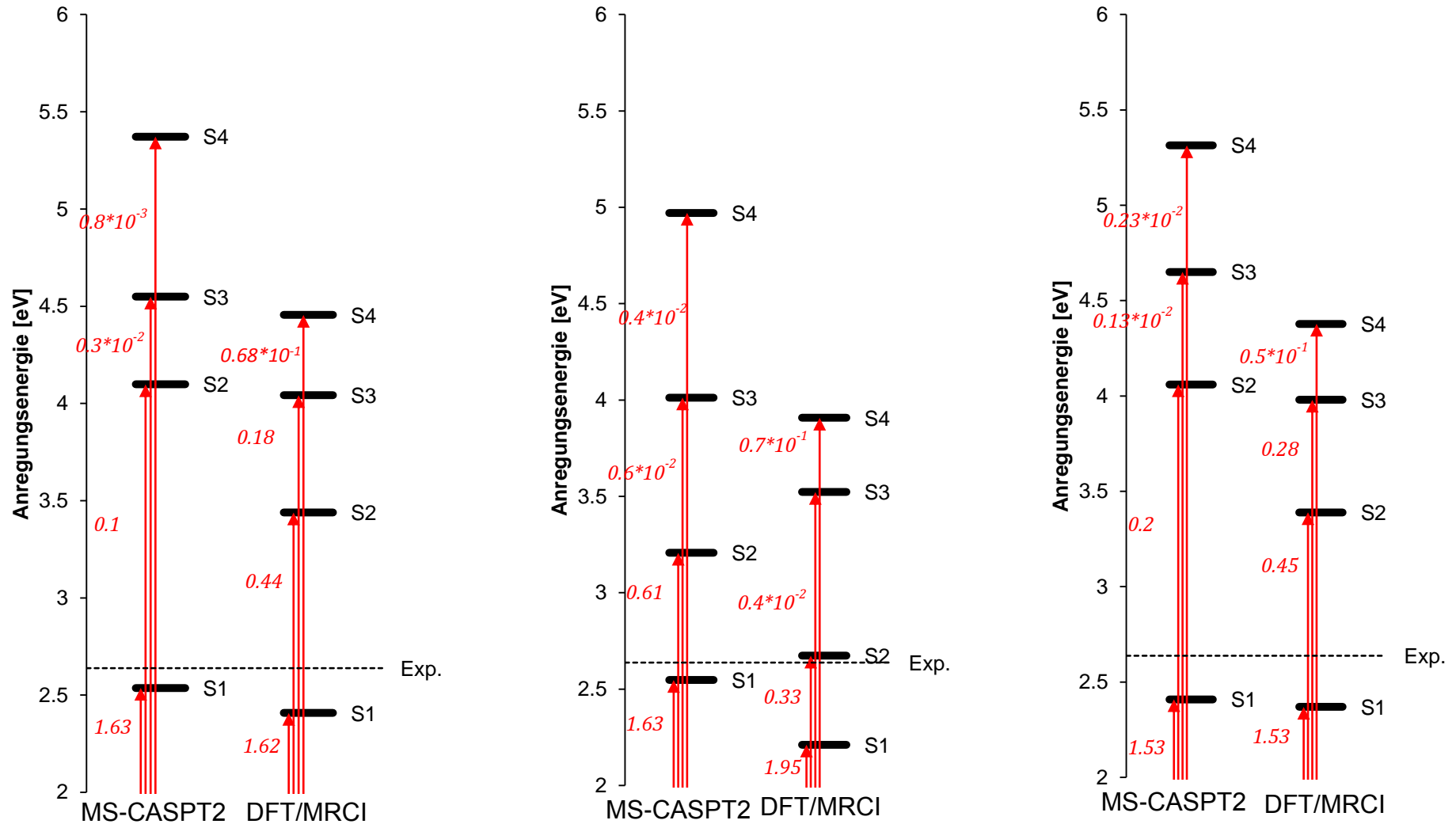


Abbildung 4-17 Anregungsenergien für das FP-Modell der HF- (links), DFT/B3LYP- (mitte) und CASSCF- (rechts) optimierten Geometrien. Gezeigt sind Ergebnisse der MS-CASPT2 und DFT/MRCI-Rechnungen. Eingezeichnet sind Oszillatorenstärken (rot) und der experimentelle Wert von 2.64 eV (gestrichelte Linie).

## 4. Ergebnisse

Alle Anregungsenergien sind gegenüber der unprotonierten Spezies deutlich rotverschoben. Abbildung 4-18 vergleicht die Anregungsenergien in die  $1B_u$  Zustände im **FP**-Modell für alle Optimierungsverfahren, mit den gleichen Tendenzen wie im zuvor behandelten Modell.

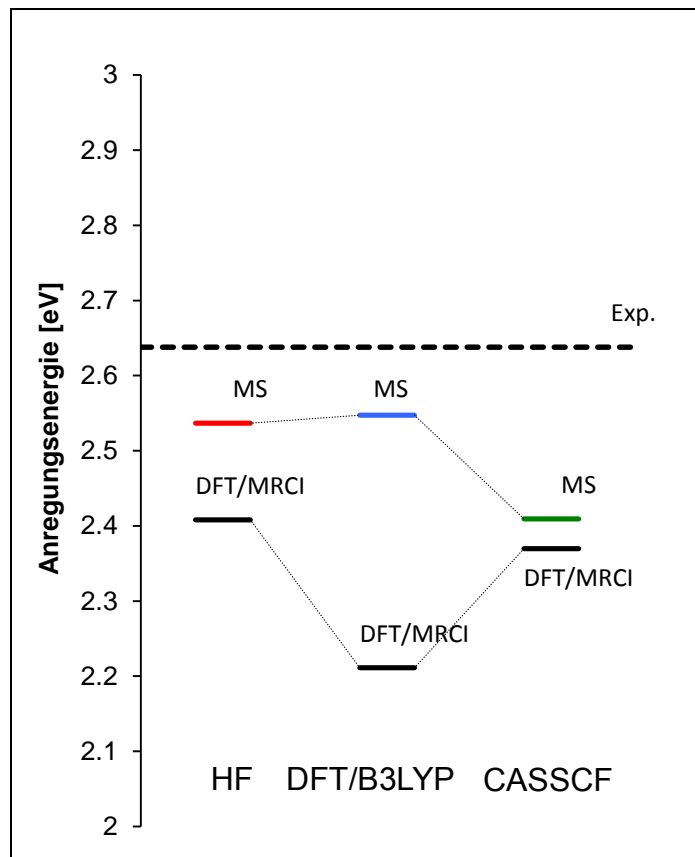


Abbildung 4-18: Anregungsenergien der MS-CASPT2 und DFT/MRCI  $1B_u$  Zustände für das **FP**-Modell der HF-, DFT/B3LYP- und CASSCF-optimierten Geometrien.

Die Rotverschiebung wird in dieser Abbildung besonders deutlich. Die Ergebnisse zeigen, dass die Lage der  $1B_u$  Bande in der unprotonierten Spezies deutlich besser wiedergegeben wird als in diesem Modell.

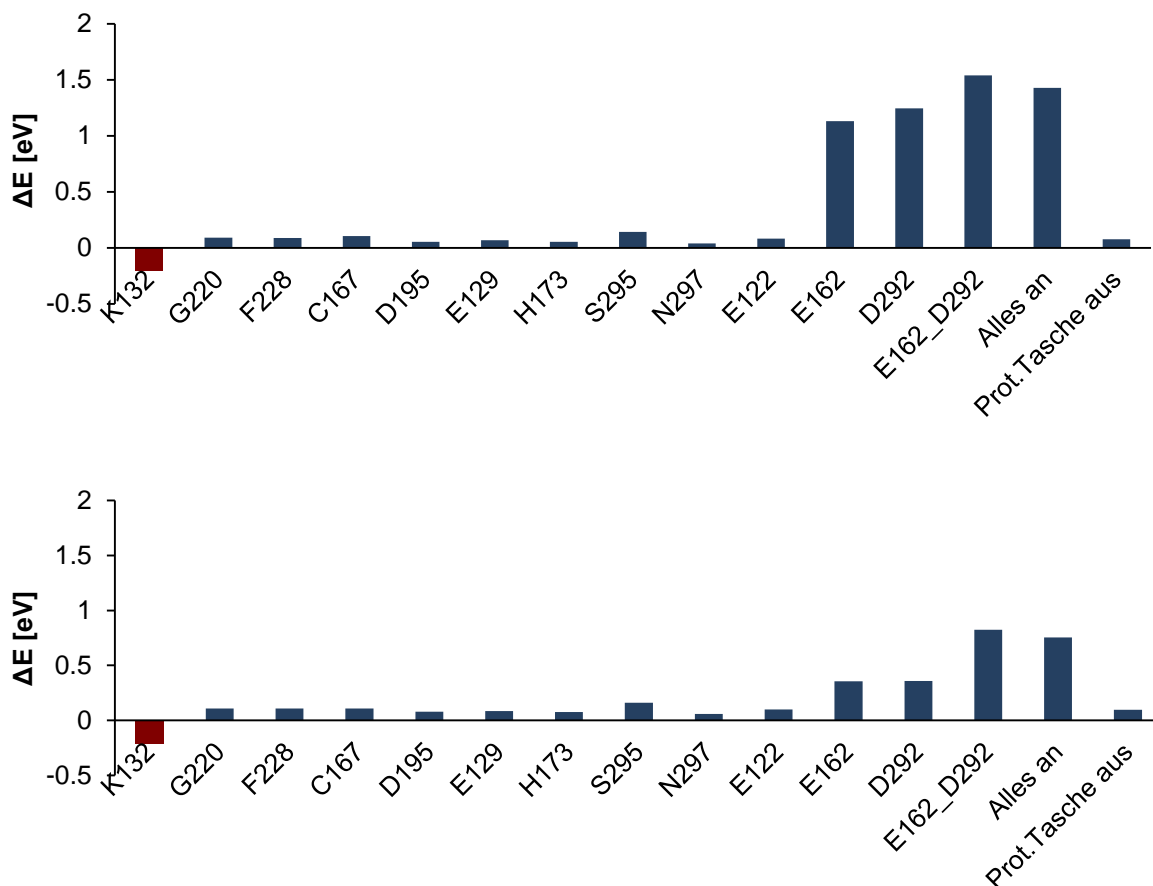
Absolute Energien für alle optimierten Geometrien sind in Tabelle A 2-1, Tabelle A 2-4 und Tabelle A 2-7 im Anhang A 2 zusammengefasst.

### 4.2 Einfluss der Umgebung auf die Absorption des all-*trans*-Retinals

Der Einfluss der Proteinumgebung auf die Absorption des Chromophors wurde anhand der CASSCF-optimierten **FP**-Struktur in Standard-Protonierung untersucht. Die Absorption des im Protein optimierten Retinals wurde im Vakuum, d.h. ohne Ladungsfeld, berechnet, und diente als Referenz für den nachfolgenden Vergleich. Es wurde der Einfluss der Aminosäuren untersucht, die auch im **MP**-Modell als beweglich ausgewählt wurden (s. Kapitel 3.1.4). Zunächst wurden die Ladungen aller aus-

## 4. Ergebnisse

gewählten Aminosäuren gleich Null gesetzt („ausgeschaltet“) und MS-CASPT2-Berechnungen wie in Kapitel 3.3 durchgeführt. Anschließend wurde jeweils die Ladung einer einzelnen Aminosäure „angeschaltet“ und ebenfalls die Absorption mit MS-CASPT2 bestimmt. Der Einfluss der Gegenionen (E162 und D292) wurde sowohl einzeln als auch gleichzeitig bestimmt. Mit Rückblick auf vorhergehende Rechnungen wird hier nur der  $S_0 \rightarrow S_1$  Übergang betrachtet. Um die starken Abweichungen bei den vorherigen SS-CASPT2 zu untersuchen, wurden hier auch die Ergebnisse der SS-CASPT2 Berechnungen hinzugezogen. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Abbildung 4-19 dargestellt. Die positiven Werte (blau) stellen eine hypsochrome Verschiebung (Blauverschiebung) bezüglich der Vakuumabsorption dar. Die negativen Werte (rot) entsprechen einer bathochromen Verschiebung (Rotverschiebung) bezüglich der Vakuumabsorption.



**Abbildung 4-19: Einfluss der einzelnen Aminosäuren auf die Absorption beim  $S_0 \rightarrow S_1$  Übergang in Bezug auf SS-CASPT2 (oben) und MS-CASPT2 (unten).**

Abbildung 4-19 zeigt, dass sowohl bei SS- als auch bei MS-CASPT2 die gleichen Aminosäuren zur Rot- bzw. Blauverschiebung beitragen. Den größten Einfluss auf die Absorption haben die Gegenionen Aspartat (D292) und Glutamat (E162), gefolgt

## 4. Ergebnisse

von Lysin (K132) und Serin (S295). Bis auf Lysin bewirken diese Aminosäuren eine hypsochrome Verschiebung.

Die einzige Aminosäure, die eine Rotverschiebung verursacht, ist Lysin (K132). Bei SS-CASPT2 beträgt die durch D292 und E162 verursachte Blauverschiebung jeweils 1.131 eV und 1.247 eV. Sind beide Gegenionen aktiv, ist deren Beitrag kleiner als die Summe der einzelnen Beiträge (1.540 eV), die Anteile sind also nicht additiv. Dies deutet auf einen gegenseitigen Einfluss der Ionen bei dieser Methode hin. In der MS-CASPT2-Beschreibung sind die Einzelbeiträge der Gegenionen deutlich kleiner (mit 0.356 eV bzw. und 0.358 eV), ca. ein Drittel des SS-CASPT2 Wertes. Sind hier beide Ionen aktiv, ergibt sich ein Wert von 0.825 eV, d.h. etwas mehr als die Summe der Einzelbeiträge. In der Beschreibung dieser Beiträge liegt offenbar der wesentliche Unterschied zwischen SS- und MS-CASPT2, diese führen zu den erheblichen Abweichungen in Kapitel 4.1.2.1 und Kapitel 4.1.2.3.

Es lässt sich schlussfolgern, dass elektrostatische Wechselwirkungen der Retinal-Schiff-Base mit den Gegenionen die  $S_0 \rightarrow S_1$  Absorption stark beeinflussen. Außer den Gegenionen sind die Beiträge aller anderen Aminosäuren bei SS- als auch bei MS-CASPT2 identisch. Des Weiteren konnte eine starke Zustandskopplung beobachtet werden, sobald eines der Gegenionen bzw. beide Gegenionen „angeschaltet“ wurden. Für die restlichen Aminosäuren ergeben sich, ähnlich wie im Vakuum, keine auffälligen Kopplungsbeiträge.

### 4.3 Struktur und Absorption des 13-*cis*-Retinals

Um die bisher unbekannte Struktur des 13-*cis* Retinals in Channelrhodopsin zu modellieren, wurde der Energiepfad entlang der Torsion um die C13=C14 Bindung im ersten angeregten Zustand verfolgt. Die Berechnung des kompletten Pfades mit CASSCF(12,12) Verfahren ist extrem aufwändig. Aus diesem Grund wurde die quantenchemische Region (vgl. Abbildung 3-4) auf drei Doppelbindungen reduziert. Allerdings ist dies eine grobe Näherung, da dabei das konjugierte  $\pi$ -System unterbrochen wird. Die Grenze der quantenchemischen Region wurde zusätzlich zwischen den Atomen C10-C11 definiert. Das C11-Atom wurde analog zur QM-Region in den vorhergehenden Rechnungen mit einem Wasserstoffatom abgesättigt. Dadurch ist die QM-Region nun mit zwei Link-Atomen versehen (Abbildung 4-20). Die MM-Region entsprach dabei der MM-Region in der Standard-Protonierung (3.1.3).

## 4. Ergebnisse

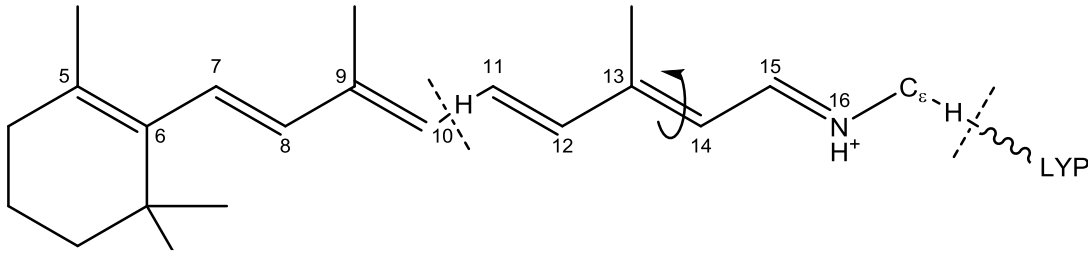


Abbildung 4-20: QM-Region für die Energiepfad-Berechnung. Mit gestrichelten Linien sind die QM/MM-Grenzen eingezeichnet. H-Linkatome dienen zur Absättigung der QM-Region.

Die Struktur mit der neuen QM-Region wurde mit der HF-Methode wie in 3.2 beschrieben in  $S_0$  optimiert. Anschließend wurde die Torsionskoordinate mit CASSCF(6,6) (s. Kapitel 3.2) im ersten angeregten Zustand verfolgt. Dabei wurde über die  $S_1$  und  $S_0$  Zustände gleichmäßig gemittelt. Die Torsion erfolgte von  $-180^\circ$  bis  $-130^\circ$  in  $10^\circ$  Schritten. Das Ergebnis der partiellen Optimierung zeigt Abbildung 4-21.

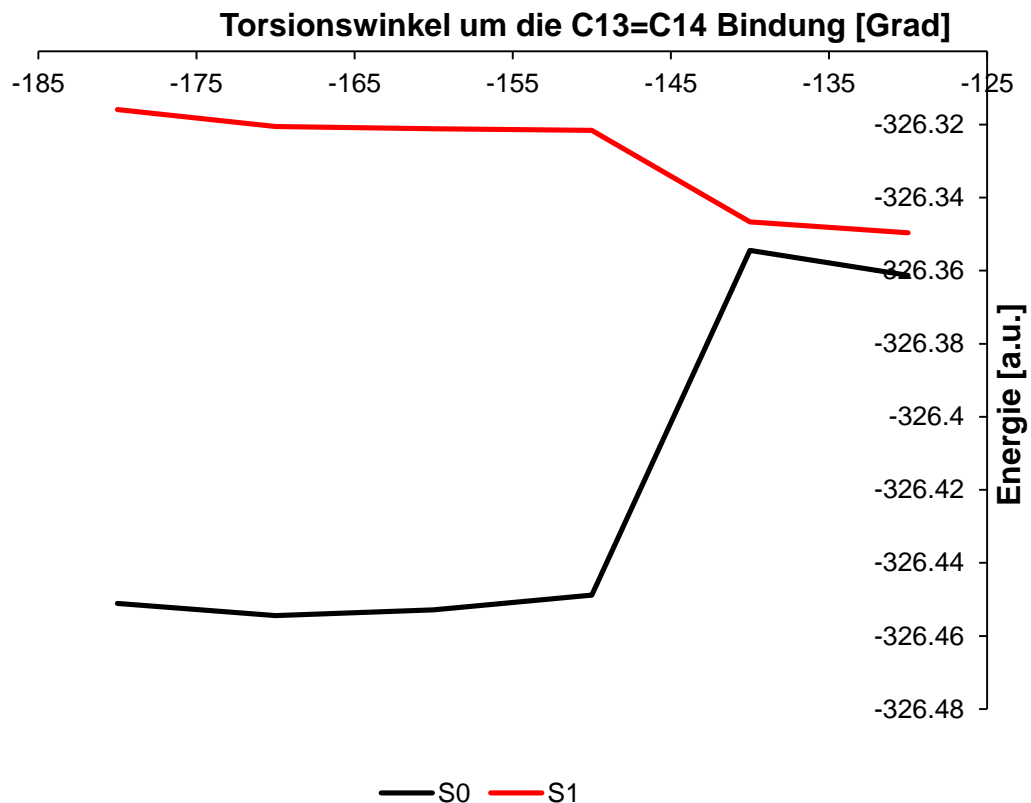
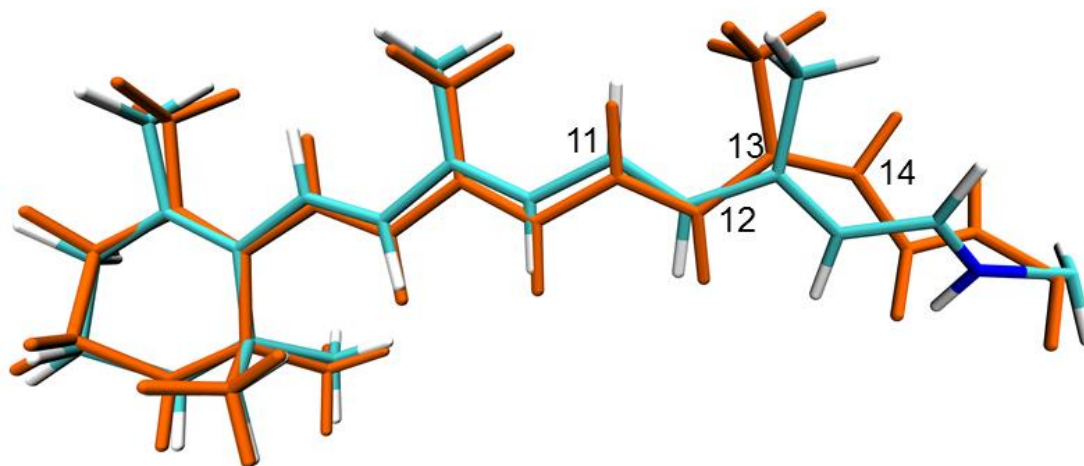


Abbildung 4-21: Energiepfad entlang der Torsion um die C13=C14 Bindung im ersten angeregten Zustand ( $S_1$ ).

Eine Analyse der CI-Koeffizienten zeigte, dass während der Berechnung der Charakter der Wellenfunktion von  $1B_u$  in der Startstruktur bereits nach dem ersten Optimierungsschritt zu  $2A_g$  wechselte. Die beschriebene Rotation erfolgte also tatsächlich im  $2A_g$  Zustand statt in  $1B_u$ . Bei  $-140^\circ$  wechselte der Charakter der Wellenfunktion erneut sehr stark. Hier hatte die Grundzustandskonfiguration das größte Gewicht in  $S_1$ ,

## 4. Ergebnisse

und die HOMO→LUMO-Einfachanregung den größten Beitrag im Grundzustand, d. h. an dieser Stelle trat ein sog. *Root-Flipping* auf, ein möglicher Hinweis auf eine nahe Entartung von  $S_0$  und  $S_1$ . Bei diesem Diederwinkel kommen sich die Potentialenergieflächen von  $S_1$  und  $S_0$  nahe. Der Unterschied beträgt etwa 0.02 a.u. (0.5442 eV). Die durchgeführte Optimierung weist bereits auf mögliche Probleme bei der Behandlung mit aufwendigeren Methoden durch naheliegende und sich überkreuzende  $2A_g$  und  $1B_u$  Zustände hin. Die erhaltene Struktur befindet sich trotzdem in der Nähe der gesuchten Durchdringung zwischen  $S_1-1B_u$  und dem Grundzustand und wurde deswegen für die Optimierung des Grundzustandes unter Fortsetzung der Torsion weiterverwendet. Diese zweite Optimierung erfolgte mit dem CASSCF(6,6) ohne Zustandsmittelung, d.h. es wurde einzig der Grundzustand berücksichtigt. Die resultierende Struktur wurde anschließend wie in Kapitel 3.2 beschrieben mit CASSCF (12,12) optimiert, wobei die quantenmechanische Region wieder auf das komplette Retinal erweitert wurde (s. Kapitel 3.1.3, Abbildung 3-4). Bis auf die benachbarten Wassermoleküle, Lysin und Retinal wurden alle anderen Aminosäuren analog zum **FP**-Modell festgehalten. In Abbildung 4-22 ist das Ergebnis der 13-*cis* Modellierung (orange) im Vergleich zur CASSCF-optimierten **FP**-Struktur (türkis) des Retinals dargestellt.

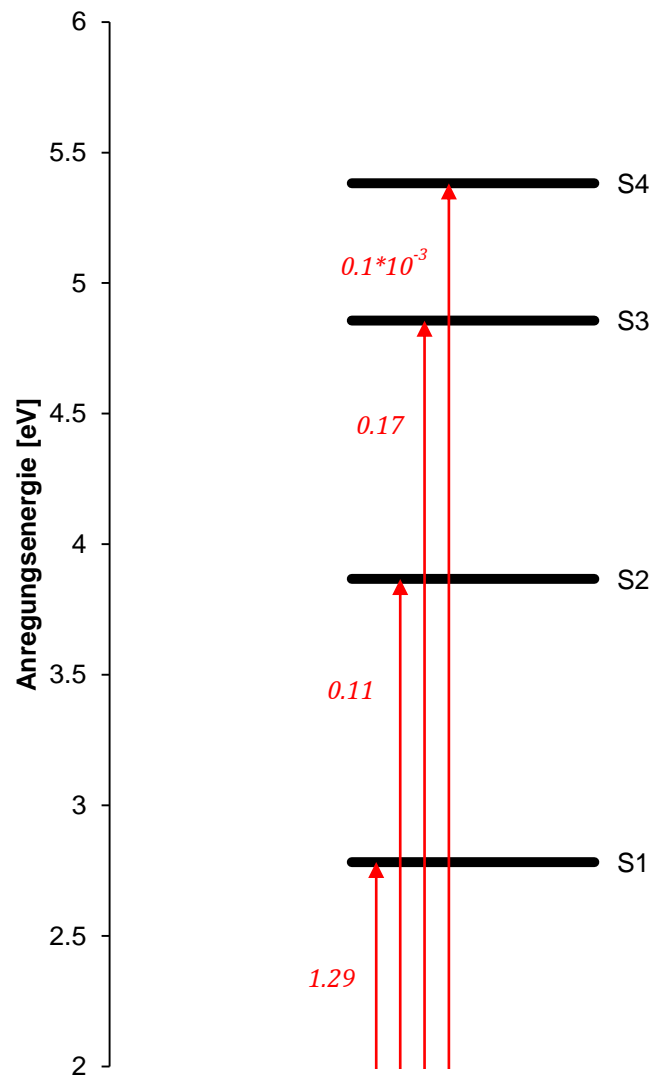


**Abbildung 4-22: Überlagerung der CASSCF-optimierten FP-Struktur (türkis) mit dem Modell des 13-*cis* Retinals (orange)**

Der Diederwinkel um die C13=C14 Bindung beträgt in der Kristallstruktur  $180^\circ$ . Bei Optimierung mit CASSCF zeigte sich eine Verdrillung um  $-171.5^\circ$  um die C13=C14 Bindung und  $-177.23^\circ$  um die benachbarte C11=C12-Bindung. Der Diederwinkel im optimierten 13-*cis* Modell entsprach  $-9.1^\circ$  um die C13=C14 Bindung und  $-173.5^\circ$  um die C11=C12-Bindung. Mit MS-CASPT2 wurden die Anregungsenergien der model-

## 4. Ergebnisse

lierten 13-*cis*-Struktur berechnet. Diese sind in der Tabelle A 3-1 im Anhang A 3 zusammengefasst. Abbildung 4-23 zeigt die Lage der angeregten Zustände sowie die entsprechenden Oszillatorenstärken.



**Abbildung 4-23: MS-CASPT2 Anregungsenergien und Oszillatorenstärken (rot) für das 13-*cis*-Modell.**

Die erhaltenen Werte sind den Ergebnissen des CASSCF-optimierten all-*trans* Retinals sehr ähnlich. Die Anregungsenergie zum  $1B_u$  Zustand ist (2.7833 eV bzw. 445 nm) mit einer Oszillatorenstärke von ( $f=1.2$ ). Der  $S_1$  Zustand des 13-*cis* Isomers ist somit um nur 0.043 eV höher als der  $S_1$  Zustand des all-*trans* Retinals, dies entspricht einer Blauverschiebung um ca. 6 nm. Im Spektrum wären die beiden Isomere in dieser Konfiguration nur schwer zu unterscheiden. Die Zusammensetzung der angeregten Zustände ist bis auf den  $S_4$  Zustand ebenfalls mit all-*trans* Retinal vergleichbar.

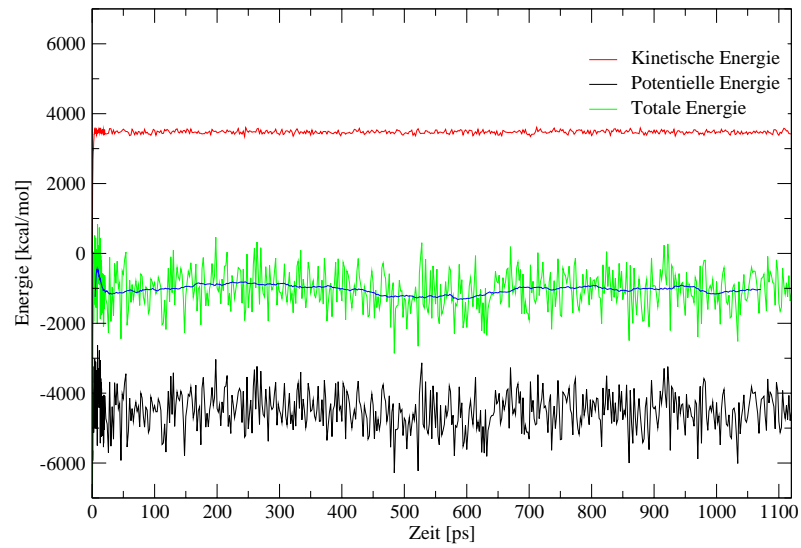
## 4. Ergebnisse

### 4.4 Stabilität der Proteinstruktur

Die Struktur von Hayashi *et al.* erscheint nach MD-Simulation deutlich verändert (Kapitel 1). Um den Einfluss von Äquilibrierung und Optimierung auf die Struktur zu untersuchen, wurden zwei MD-Simulationen durchgeführt. Diese basierten auf der Struktur mit Standard-Protonierung ohne Berücksichtigung der QM-Parameter/Topologiedatei (s. Kapitel 3.1.3). Insgesamt wurden zwei Simulationen durchgeführt. Bei einer Simulation wurde das Verhalten des Proteins im Vakuum überprüft, für die zweite Simulation wurde das System in eine Wassersphäre von 60 Å Durchmesser eingebettet. Vor jedem MD-Lauf wurde eine initiale Minimierung durchgeführt. Diese erfolgte in jeweils 250 Zyklen SD- und CG-Methoden. Anschließend wurde das System von 0K auf 300K innerhalb von 20 ps aufgeheizt. Beim Aufheizen des Systems mit der Wassersphäre wurde das Protein mit schwacher Kraft ( $10 \text{ kcal/mol-Å}^2$ ) festgehalten, um starke Fluktuationen zu vermeiden. Nach der Aufheizphase wurden jeweils 1100 ps MD-Simulationen bei konstanter Temperatur (300 K) zur Äquilibrierung gestartet.

In Abbildung 4-24 sind potentielle, kinetische und totale Energien während der Aufheizphase und MD-Laufs für die Simulation im Vakuum (a) und in der Wassersphäre (b) dargestellt. Nach 20 ps der Aufheizphase oszilliert das System sehr schnell um einen konstanten Mittelwert, der sich im Laufe der nächsten 1000 ps nicht wesentlich ändert. Die kinetische Energie bleibt dabei konstant. Beide Strukturen scheinen gegen Ende der Simulation ausreichend äquilibriert zu sein.

a)



b)

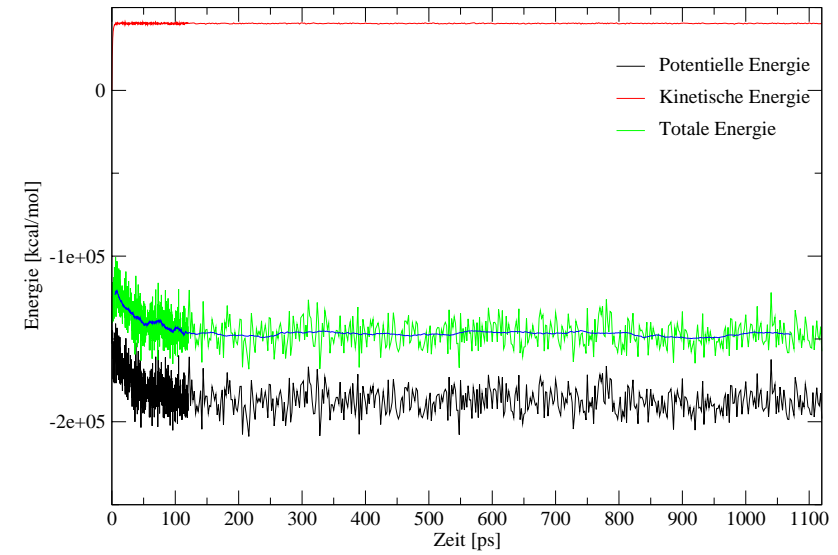
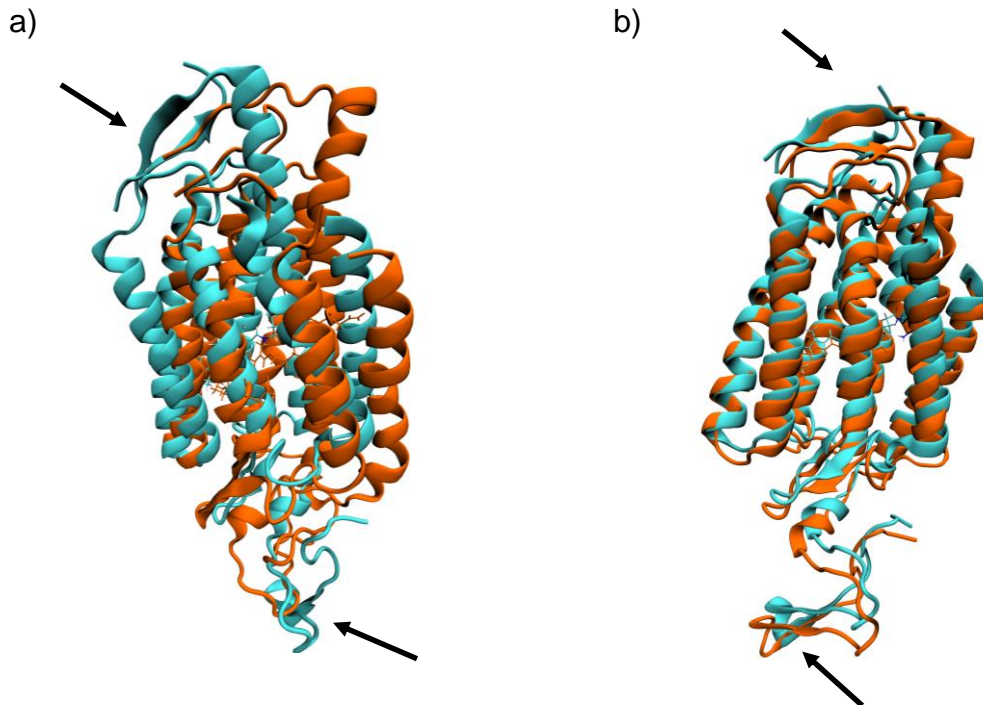


Abbildung 4-24: MD-Simulation (1.12 ns) im Vakuum (a) und im Wasser (b). Gezeigt wird die zeitliche Änderung der potentiellen (schwarz), kinetischen (rot) und totalen (grün) Energie. Mit blauer Linie sind über 50 ps gemittelte Energiewerte gekennzeichnet.

## 4. Ergebnisse

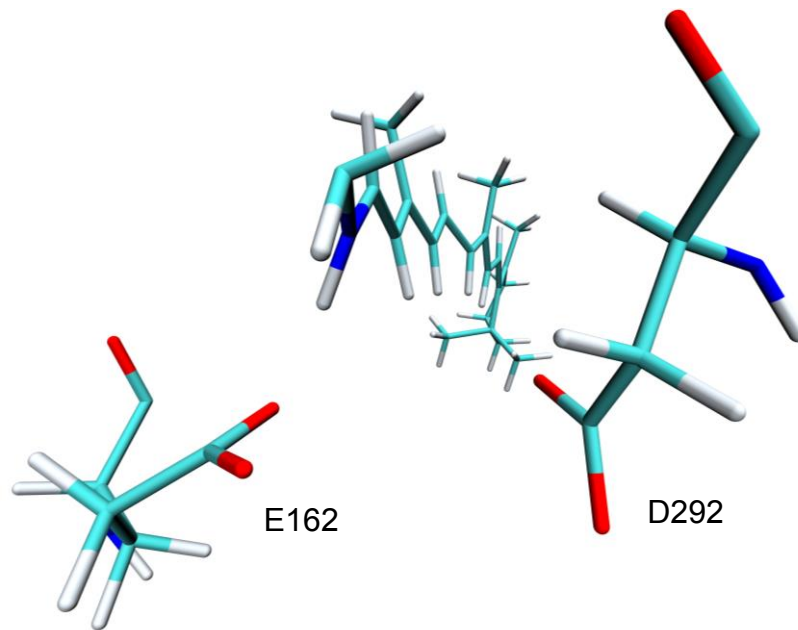
In Abbildung 4-25 wird die Proteinstruktur nach der Simulation (orange) im Vakuum (a) und im Wasser (b) mit der Kristallstruktur (türkis) verglichen.



**Abbildung 4-25: Vergleich der Proteinstruktur nach 1.12 ns MD-Simulation (orange) im Vakuum (a) und im Wasser (b) mit der Kristallstruktur (türkis). Mit Pfeilen sind  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen in der Kristallstruktur gekennzeichnet.**

Im Vakuum ist eine deutliche Auslenkung bei den Helizes zu sehen, die mit Schutzgruppen abgesättigt wurden (s. Kapitel 3.1.2). Diese sind während der MD-Simulation sehr flexibel. Zudem verschwinden die  $\beta$ -Faltblattstrukturen der extra- und intrazellulären Regionen. (Abbildung 4-25, mit einem Pfeil gekennzeichnet). Im Vergleich zur Kristallstruktur beträgt der ermittelte RMSD-Wert für das Proteinerückgrat 9.7 Å. Dies weist auf eine deutliche Abweichung von der Kristallstruktur hin. Die erhaltene Geometrie erscheint für weitere Simulationen nicht sinnvoll. Bei der Simulation in der Wassersphäre wurde eine deutlich kleinere Auslenkung der Helizes im Vergleich zur Simulation im Vakuum beobachtet. Dabei bleiben die Sekundärstrukturen erhalten. Der RMSD-Wert für das Proteinerückgrat beträgt 2.61 Å und ist somit deutlich kleiner als nach der MD-Simulation im Vakuum. Bei beiden Simulationen wurde die Auslenkung der Schiff-Base sowohl in Richtung des Gegenions Asp292 als auch in Richtung des Gegenions Glu162 beobachtet (s. Abbildung 4-26).

#### 4. Ergebnisse



**Abbildung 4-26: Auslenkung der Schiff-Base zum Gegenion E162 während der MD-Simulation**

Dies deutet darauf hin, dass beide Gegenionen als mögliche Protonenakzeptoren nach der Anregung des Retinals in Frage kommen.

Die Proteinstruktur in der Wassersphäre wird durch das Lösungsmittel stabilisiert. Dabei erweisen sich die unvollständigen Helizes weniger flexibel und die Abweichung von der Kristallstruktur wird demnach kleiner.

## 5 Diskussion

Alle Modelle in der Standard-Protonierung weisen die gleiche Tendenz während der QM/MM-Geometrieoptimierungen auf. Dabei zeigte sich eine deutliche Auslenkung des Schiff-Base-Terminus in Richtung des Gegenions Asp292. Dies deutet auf Asp292 als möglichen primären Protonenakzeptor hin. Diese Überlegung geht mit den Ergebnissen der Mutationsstudien von Kato *et al.* einher (s. Kapitel 1). Alle optimierten Strukturen zeigen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Schiff-Base, dem Gegenion Asp292 und dem benachbarten Wasser. MD-Simulationen von Kamiya *et al.* resultieren in Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Schiffbase und dem Gegenion Glu162. MD-Simulationen in der vorgelegten Arbeit zeigen ebenfalls neben der Auslenkung der Schiff-Base in Richtung des Aspartats eine Verdrillung in Richtung des Gegenions Glu162. Dies ist damit zu erklären, dass bei der QM/MM-Optimierung nur das lokale Minimum bestimmt wird, während mit Hilfe der MD-Simulationen weitere Energieminima auf der Potentialenergiefläche aufgefunden werden können. Der Vergleich der **FP**-, **E\_D**- und **MP**-Modelle zeigt, dass je mehr Reste beweglich sind, desto mehr ändert sich das System. Folglich soll das **E\_D**-Modell nicht als Ausgangsstruktur für weitere Untersuchungen dienen, sondern eher das **MP**-Modell erweitert werden. Die Diederwinkelanalyse des Retinals ergab eine starke Abweichung von der Kristallstruktur in der Nähe der Schiff-Base.

Mit Hilfe von MS-CASPT2 konnte anhand der Standard-protonierten Struktur der experimentelle Wert für die maximale Absorption reproduziert werden. DFT/MRCI liefert ebenfalls Ergebnisse in guter experimenteller Übereinstimmung, die jedoch eine größere Abweichung im Vergleich zu MS-CASPT2 zeigen. Der experimentell vergleichbare  $1B_u$  Zustand entspricht dabei einem  $S_0 \rightarrow S_1$  Übergang, wie es erfahrungsgemäß für die Retinalproteine zu erwarten ist [7].  $S_2$  hat in MS-CASPT2 bis auf DFT/B3LYP optimierte Strukturen überwiegend  $2A_g$  Charakter und ist bei großer Bindungsalternanz schwach erlaubt, bei geringer Alternanz stark erlaubt. An der DFT/B3LYP-Geometrie weist die  $S_2$  Wellenfunktion hauptsächlich HOMO  $\rightarrow$  LUMO Doppel- und Einfachanregungen auf. Die geringe Bindungsalternanz verringert den Abstand zwischen  $S_1$  und  $S_2$ . Dies ließe sich mit der Beschaffenheit der Molekülorbitale erklären, wenn sich in  $S_2$  die Bindungsordnungen ändern würden, d.h. Doppelbindungen hätten einen Einfachbindungscharakter und Einfachbindungen einen Doppelbindungscharakter. Folglich wäre die delokalisierte  $\pi$ -Elektronen-Dichte im Grundzustand der

## 5. Diskussion

Elektronendichte im  $2A_g$  Zustand ähnlicher. Dies würde in Verringerung der Energiedifferenz zwischen  $S_0$  und  $S_2$  und niedrigerer Anregungsenergie führen. Somit wäre auch der Abstand zwischen  $S_1$  und  $S_2$  kleiner. Die DFT/MRCI-Berechnung zeigt dabei die gleiche Tendenz für die DFT/B3LYP-optimierte Geometrie. In der Literatur gibt es jedoch Hinweise auf die Umkehr der Bindungsalternanz im  $1B_u$  Zustand [74], [75]. Um eine Aussage über die Bindungsalternanz der  $S_1$  und  $S_2$  Zustände treffen zu können, müssten die Geometrien der  $1B_u$  und  $2A_g$  Zustände optimiert werden. Für die HF- und CASSCF-Geometrien ist in DFT/MRCI der  $2A_g$  Charakter von  $S_2$  nicht so deutlich ausgeprägt.

Die CASSCF-Berechnungen ergeben, wie erwartet, zu hohe Anregungsenergien aufgrund des fehlenden Beitrags der dynamischen Elektronenkorrelation und dienen nur als Referenz für die CASPT2-Berechnungen.

Mit Hilfe von SS-CASPT2 wird die Zustandskopplung nicht erfasst, wodurch diese Methode sich nicht als optimal für die Beschreibung der angeregten Zustände des Retinals erwiesen hat.

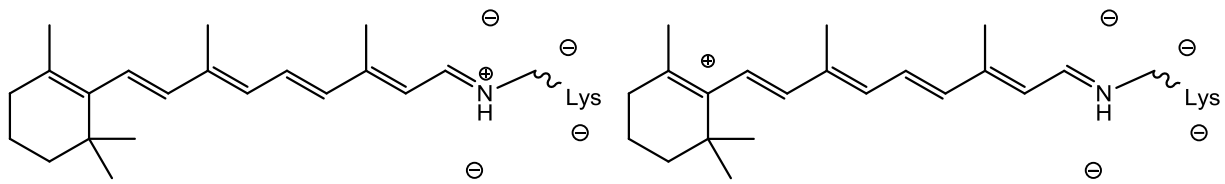
Der Einfluss des Ladungsfeldes auf die Bestimmung der Absorptionsenergie mit MS-CASPT2 ist nicht zu vernachlässigen. So tritt eine Änderung der  $S_0$ - $S_1$  Absorption in Abhängigkeit von der Bindungsalternanz bei MS-CASPT2 nur im Vakuum auf. DFT/MRCI dagegen weicht vom erwarteten Schema nicht ab: Je niedriger die Bindungsalternanz, desto niedriger ist die entsprechende Anregungsenergie.

Die Geometrieoptimierung der GLH162-Modelle zeigte den gleichen Trend wie in der Standard-Protonierung. Alle Anregungsenergien der protonierten Spezies (GLH162) sind erwartungsgemäß gegenüber der Standard-protonierten Struktur rotverschoben. Die fehlende negative Ladung des Gegenions Glu162 trägt zur Destabilisierung des Grundzustands bei und führt somit zu höheren Grundzustandsenergien. Der Charakter der Zustände zeigt für die GLH162-Struktur nahezu die gleichen Trends wie für die protonierte Spezies. Eine Ausnahme stellt die DFT/B3LYP-optimierte Geometrie dar, deren  $S_2$  Zustand in DFT/MRCI einen deutlichen  $2A_g$  Charakter zeigt.

In Kapitel 4.2 wurde der Einfluss bestimmter Aminosäuren aus der Retinal-Bindetasche auf die Absorption des all-*trans* Retinals untersucht. Es wurde festgestellt, dass die negativ geladenen Gegenionen Asp292 und Glu162 sowohl einzeln als auch zusammen den größten Einfluss auf den  $1B_u$  Zustand haben. Dabei verursachen sie wie erwartet eine Blauverschiebung der Absorption. Wie von *Welke et al.*

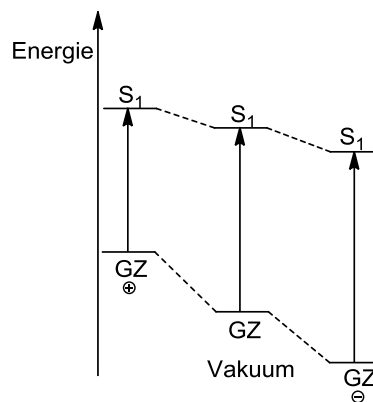
## 5. Diskussion

[9] beschrieben, wird die positive Ladung der Schiff-Base bei der Anregung in Richtung des  $\beta$ -Ionon Rings umverteilt (Abbildung 5-1).



**Abbildung 5-1: Retinal umgeben von negativen Ladungen nahe des Schiff-Base-Terminus im Grundzustand (links) und im angeregten Zustand (rechts).**

Der Einfluss der Ladungen auf die Lage des Grundzustands (GZ) und des ersten angeregten (Singulett-) Zustands ist in Abbildung 5-2 schematisch dargestellt.



**Abbildung 5-2: Einfluss der negativen (-) und positiven (+) Ladungen nahe dem Schiff-Base-Terminus des Retinals auf die Lage des Grund- und des ersten angeregten (Singulett-) Zustandes ( $S_1$ ) relativ zu Vakuum.**

Über Coulomb-Wechselwirkungen wird die positive Ladung am Schiff-Base-Terminus im GZ durch die umgebenden negativen Ladungen stabilisiert, d.h. relativ zu Vakuum energetisch abgesenkt. Nach der Anregung in den  $S_1$  Zustand entfernt sich die positive Ladung von den stabilisierenden negativen Ladungen, wodurch die Coulomb-Wechselwirkungen schwächer werden. Dies führt zu einer geringeren Stabilisierung des  $S_1$  Zustandes relativ zum GZ und zu einer größeren Energiedifferenz zwischen GZ und  $S_1$  bezogen auf Vakuum. Dagegen destabilisieren positive Ladungen in der Nähe des Schiff-Base-Terminus den Grundzustand und den  $S_1$  Zustand, so dass die Energiedifferenz zwischen  $S_1$  und GZ kleiner wird. Der Einfluss der Gegenionen ist nicht additiv, was schon von *Welke et al.* beobachtet wurde. Erwartungsgemäß trägt das positiv geladene Lys132 in der Nähe der Schiff-Base zur Rotverschiebung bei, wie ebenfalls von *Welke et al.* und *Kamiya et al.* beobachtet wurde [9], [23]. Des Wei-

## 5. Diskussion

teren ließ sich feststellen, dass die Zustandskopplung in  $S_1$  und  $S_2$  Zuständen durch den Einfluss der Gegenionen verursacht wird.

Für die Standard-protonierte Startstruktur konnte ein Zusammenhang zwischen der  $S_0 \rightarrow S_1$  Absorption und den strukturellen Veränderungen während der Geometrieoptimierungen festgestellt werden. Annäherung bzw. Entfernung des Gegenions Glu162 führt entsprechend zur Erhöhung bzw. Verminderung der Anregungsenergie. Im Gegensatz dazu wurde für die GLH162-Startstruktur kein direkter Zusammenhang zwischen den strukturellen Veränderungen und der Absorptionsenergie festgestellt. Offensichtlich wird die Absorption durch Wechselwirkung beider negativ geladenen Gegenionen beeinflusst.

Analog zu den anderen Retinalproteinen (s. Kapitel 1.1) wurde bei der Isomerisierung des Retinals eine konische Durchdringung erwartet. Mit den hier verwendeten Verfahren wurde diese nicht aufgefunden. Um die Suche nach konischer Durchdringung zu optimieren sollte die Energiedifferenz zwischen  $S_0$ - $S_1$  minimiert werden und der CASSCF-Raum auf wenigstens CAS (10,10) erweitert werden. Allerdings weist die Berechnung des Energiepfades auf mögliche Probleme durch sich überkreuzende  $2A_g$  und  $1B_u$  Zustände hin. Das Modell des 13-*cis* Retinals zeigt eine mit all-*trans* Retinal vergleichbare Absorption des  $1B_u$  Zustandes. Der Unterschied beträgt nur 0.042 eV. Aufgrund der durch die *cis-trans* Isomerisierung leicht verminderten Konjugation wurde eine geringe Blauverschiebung erwartet. Eine Verdrillung der zu C13=C14 benachbarten C11=C12-Bindung deutet weitere Geometrieänderung an.

Während der MD-Simulation im Vakuum wurde eine deutliche Mobilität der Helizes und Entfaltung der Sekundärstrukturen festgestellt. Des Weiteren zeigte sich eine erhebliche Abweichung relativ zur Kristallstruktur (RMSD=9.7 Å). Die im Vakuum optimierte Struktur kommt für weitere Studien somit nicht in Frage. Durch Einfügen des Lösungsmittels gewinnt die Proteinstruktur erwartungsgemäß an Stabilität. Für diese beträgt der RMSD-Wert 2.61 und ist mit der Auflösung der Kristallstruktur vergleichbar (2.3 Å).

### 6 Zusammenfassung

Die Anwendungsmöglichkeiten der Channelrhodopsine in Neuromedizin und Optogenetik sind vielversprechend. Die Wiederherstellung des Sehvermögens oder die Heilung von neurodegenerativen Erkrankungen mit nicht-invasiven Methoden rückt damit in erreichbare Nähe. Bisher ist jedoch wenig über den Mechanismus der ChRs bekannt. Ziel dieser Arbeit war, die Optimierung des Retinal-Chromophors in der kürzlich aufgeklärten C1C2-Kristallstruktur [7] mit einem QM/MM-Ansatz unter Verwendung verschiedener QM-Methoden (HF, DFT/B3LYP, CASSCF) zu optimieren und die angeregten Zustände mit Hilfe von SS/MS-CASPT2 und DFT/MRCI zu charakterisieren. Der Einfluss der Proteinumgebung und der Protonierungszustände der Gegenionen in der Nähe des Chromophors war dabei von besonderem Interesse. Ein weiteres Ziel war es, die Geometrie des 13-*cis*-Retinals zu modellieren und deren Absorptionseigenschaften zu untersuchen. Um die Flexibilität des Systems zu beurteilen und Proteinstrukturen für zukünftige Studien zu äquilibrieren, sollten MD-Simulationen im Vakuum und in Lösung durchgeführt werden.

QM/MM-Geometrieoptimierungen liefern einen deutlichen Hinweis auf Asp292, das Gegenion der Retinal-Schiff-Base, als möglichen Protonenakzeptor nach der Relaxation in den Grundzustand. Die durchgeführten MD-Simulationen zeigen, dass sowohl das Gegenion Asp292 als auch Glu162 als Protonenakzeptor fungieren kann. Ähnlich zur Studie von Kamiya *et al.* zeigt Retinal eine veränderte Geometrie relativ zur Kristallstruktur im Bereich des Schiff-Base-Terminus. Modelle mit unterschiedlicher beweglicher Region (**FP**, **E\_D** und **MP**) zeigen mit steigender Anzahl flexibler Reste mehr strukturelle Veränderungen. HF- und CASSCF-Verfahren liefern Strukturen mit hoher Bindungsalternanz, wobei die HF-Methode die beste Übereinstimmung mit der Kristallstruktur zeigt. DFT/B3LYP-Optimierung führt zu Strukturen mit delokalisierte Elektronendichte.

Der Grundzustand so wie die angeregten Zustände können mit MS-CASPT2 bzw. DFT/MRCI vergleichbar gut beschrieben werden, wobei DFT/MRCI eine weniger zeitintensive Methode ist. Die Grundzustandswellenfunktionen in DFT-MRCI-Berechnungen zeigen einen höheren Anteil der geschlossenschaligen HF-Konfiguration als in MS-CASPT2 (ca. 90% gegenüber ca. 70%). In allen Berechnungen entspricht der  $1B_u$  Zustand  $S_1$  und erfährt die höchste Oszillatorenstärke.  $S_2$  hat in MS-CASPT2 bis auf die DFT/B3LYP optimierten Strukturen überwiegend  $2A_g$  Cha-

## 6. Zusammenfassung

rakter und die Absorption ist bei hoher Bindungsalternanz schwach dipolerlaubt, bei geringer Alternanz stark erlaubt. DFT/B3LYP optimierte Modelle zeigen in MS-CASPT2 eine Mischung aus doppelt- und einfachangeregten HOMO→LUMO Konfigurationen für den  $S_2$  Zustand. In DFT/MRCI ist der  $2A_g$  Charakter von  $S_2$  bis auf die DFT/B3LYP-optimierte Geometrie des GLH162-Modells nicht deutlich ausgeprägt.

Mit Hilfe von MS-CASPT2- und DFT/MRCI-Methoden wurde in der Standardprotonierten Struktur eine gute Übereinstimmung mit dem experimentellen Wert der maximalen Absorption für den  $1B_u$  Zustand erreicht. Dagegen weist der  $1B_u$  Zustand in der GLH162-Struktur eine erhebliche (bis zu 0.4 eV) Rotverschiebung bezüglich des Experiments auf und entspricht somit wahrscheinlich nicht dem reellen Protonierungszustand.

Den größten Einfluss auf die  $S_0$ → $S_1$  Absorption haben die Gegenionen Aspartat (D292) und Glutamat (E162), gefolgt von Lysin (K132) und Serin (S295). Alle Aminosäuren bis auf Lysin verursachen eine Blauverschiebung.

Der  $S_1$  Zustand des 13-*cis* Isomers ist um nur 0.043 eV höher als der  $S_1$  Zustand des all-*trans* Retinals. Dies entspricht einer Blauverschiebung um ca. 6 nm. Im Spektrum wären die beiden Isomere in dieser Konfiguration nur schwer zu unterscheiden. Genauere Aussagen über die Absorption des 13-*cis*-Retinals können nach der Optimierung in der mobilen Umgebung getroffen werden.

Die MD-Simulation im Vakuum führt teilweise zur Entfaltung der Sekundärstrukturen und zu hoher Flexibilität der unvollständigen Helizes. Aufgrund eines hohen RMSD-Wertes (9.7 Å) kommt eine auf diese Weise äquilibrierte Struktur für weitere Untersuchungen nicht in Frage. MD-Simulation in der Wassersphäre lieferten dagegen eine ausreichend äquilibrierte Geometrie mit geringerer Abweichung von der Kristallstruktur (RMSD=2.6 Å), die in weiteren QM/MM Studien sinnvoll verwendet werden kann.

## 7 Summary

Channelrhodopsins (ChRs) provide promising applications in optogenetics and neuromedicine. Noninvasive treatment of macular degeneration or neurodegenerative diseases may become accessible through these photoreceptor proteins. Yet, little is known about light induces and thermal reaction mechanisms in ChRs. A central goal of this project was the optimization of the retinal chromophore in the recently solved crystal structure of C1C2, a chimera of channelrhodopsin-1 and channelrhodopsin-2 from *Chlamydomonas reinhardtii*, and the characterization of its excited states. The chromophore was optimized in the protein binding pocket using different mobile regions (frozen pocket (**FP**), movable counterions (**E\_D**) and movable pocket (**MP**)). For geometry optimizations a combined quantum mechanical/molecular mechanical (QM/MM) approach was used, comparing different QM-methods (HF<sup>l</sup>, DFT/B3LYP<sup>m</sup>, CASSCF<sup>n</sup>). Vertical excitation energies were calculated using multiconfigurational single state/multi state-CASPT2 and DFT/MRCI methods. The influence of the protein environment near the chromophore was of particular interest for this issue. Different protonation states of the counterions Glu162 (E162) and Asp (D292) were considered. In the model with standard protonation both counterions were deprotonated. The GLH162-structure presents deprotonated D292 and protonated E162. Moreover, the geometry of 13-*cis* retinal, the first photointermediate within the ChR photo cycle, was modeled and its excited state properties. We also studied the flexibility of the system in vacuum and in solution with Amber Molecular Dynamics (MD) simulations.

QM/MM geometry optimizations suggest Asp292, a counterion of retinal Schiff base, as primary proton acceptor after relaxation to the ground state, while MD simulations showed that both Glu162 and Asp292 counterions can serve as proton acceptors. The structure of the Schiff base terminus differs significantly from the crystal structure, similar to observations made by Kamiya *et al.* HF and CASSCF methods lead to structures with high bond length alternation with HF showing the best overall agreement with the crystal structure. DFT/B3LYP optimization leads to delocalized electron density and less bond alternation. The **MP** model showed major structural differences compared to the constrained **E\_D** and **FP** models.

---

<sup>l</sup> Hartree-Fock method

<sup>m</sup> Density-Functional-Theory with Becke, three-parameter, Lee-Yang-Parr functional

<sup>n</sup> The Complete Active Space Self Consistent Field method

## 7. Summary

Ground and excited states are well described with both, MS-CASPT2 and DFT/MRCI methods, with DFT/MRCI being more timesaving. The DFT/MRCI wavefunction had a higher amount of closed shell HF-configuration than MS-CASPT2 (90% and 70% respective). In all calculations  $S_1$  corresponds to  $1B_u$  state with the highest oscillator strength. The  $S_2$  state had mainly  $2A_g$  character in the MS-CASPT2 descriptions, except for the DFT/B3LYP optimized structures.  $S_2$  absorption was weakly dipole allowed at high bond length alternation and strongly allowed at low bond length alternation. DFT/B3LYP optimized models showed a mixture of singly and doubly excited HOMO $\rightarrow$ LUMO configurations in the MS-CASPT2 calculated  $S_2$  state. DFT/MRCI calculations revealed no pronounced  $2A_g$  character for this state, except for the DFT/B3LYP-optimized geometry of the GLH162 structure.

MS-CASPT2 and DFT/MRCI reproduced the experimental value for the maximum absorption of the  $1B_u$  state within the standard protonated structure in good accuracy. On the other hand, the  $1B_u$  state of the GLH162-structure was strongly red shifted (up to 0.4 eV) compared to the experiment. Hence, this configuration is not consistent with the real protonation state.

$S_0\rightarrow S_1$  is mostly influenced by the counterions E162 and D292, followed by lysine (K132) and serine (S295). All amino acids besides lysine caused a blue shift. Lysine leads to red shifted absorption.

The  $S_1$  state of the 13-*cis* isomer is blue shifted by only 0.043 eV (6 nm) compared to all-*trans* retinal. These two isomers would be difficult to distinguish in an absorption spectrum. More exact predictions about the 13-*cis* absorption can be made after optimization of its structure in a mobile protein environment.

MD simulations in vacuum led to partly unfolded secondary structures and high flexibility of substituted helices (which were not resolved in the crystal structure). Due to the high RMSD of protein backbone (9.7 Å) this structure should not be used for further experiments. MD simulation in a water sphere resulted in a more stable structure with less deviation from the crystal structure (RMSD=2.6 Å), which can be used in future QM/MM studies.

## 8 Ausblick

Weitere Methoden für die Geometrieoptimierung (z.B. CASPT2 oder Møller-Plesset Theorie zweiter Ordnung, kurz MP2) können hinzugezogen werden, um den Einfluss der Bindungsalternanz auf die Absorptionseigenschaften und Zusammensetzung der Zustände weiter zu untersuchen und mit bestehenden Ergebnissen zu vergleichen.

Gezielte Abstandsänderung zwischen Gegenionen und der Schiff-Base und darauf folgende Berechnung der Anregungsenergien könnte genauere Aussagen über den Einfluss des Abstands auf die Absorption liefern.

Zur Klärung der Bindungsalternanz der  $1B_u$  und  $2A_g$  Zustände sollten deren Geometrien optimiert werden.

Das **MP**-Modell kann durch weitere bewegliche Aminosäuren erweitert werden, um Änderungen in der Umgebung des Retinals möglichst vollständig zu erfassen. Parallel dazu könnten zu der Kristallstruktur mittels Homologie-Modellierung fehlende Strukturen hinzugefügt werden, um die Stabilität des Proteins während der MD-Simulationen zu erhöhen. Zur weiteren Stabilisierung kann eine Modellierung der Zellmembran dienen. Anschließend können MD-äquilibrierte Strukturen ebenfalls für QM/MM-Studien verwendet werden.

Die Absorption des 13-*cis*-Retinals kann durch Nachrelaxieren der Umgebung mit gleichzeitiger Optimierung der Retinalstruktur genauer bestimmt werden. Ein weiterer Schritt in der Verbesserung des 13-*cis*-Models wäre die Berechnung des Energiepfades mit wenigstens einer CASSCF(10,10)-Beschreibung.

Des Weiteren könnten Photointermediate des ChR-Photozyklus modelliert und deren Photochemie untersucht werden.

## 9 Literaturverzeichnis

- [1] H. Peter and H. Harz, "Rhodopsin-regulated calcium currents in *Chlamydomonas*," *Lett. to Nat.*, vol. 351, pp. 489–491, 1991.
- [2] S. Ehlenbeck, D. Gradmann, F.-J. Braun, and P. Hegemann, "Evidence for a light-induced H(+) conductance in the eye of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*," *Biophys. J.*, vol. 82, pp. 740–51, 2002.
- [3] G. Nagel, T. Szellas, W. Huhn, S. Kateriya, N. Adeishvili, P. Berthold, D. Ollig, P. Hegemann, and E. Bamberg, "cation-selective membrane channel," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 100, pp. 13940–13945, 2003.
- [4] G. Nagel, D. Ollig, M. Fuhrmann, S. Kateriya, A. M. Musti, E. Bamberg, and P. Hegemann, "Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae," *Science*, vol. 296, pp. 2395–2398, 2002.
- [5] K. Deisseroth, G. Feng, A. K. Majewska, G. Miesenböck, A. Ting, and M. J. Schnitzer, "Next-generation optical technologies for illuminating genetically targeted brain circuits," *J. Neurosci.*, vol. 26, pp. 10380–10386, 2006.
- [6] M.-K. Verhoeven, C. Bamann, R. Blöcher, U. Förster, E. Bamberg, and J. Wachtveitl, "The photocycle of channelrhodopsin-2: ultrafast reaction dynamics and subsequent reaction steps," *Chemphyschem A Eur. J. Chem. Phys. Phys. Chem.*, vol. 11, pp. 3113–3122, 2010.
- [7] H. E. Kato, F. Zhang, O. Yizhar, C. Ramakrishnan, T. Nishizawa, K. Hirata, J. Ito, Y. Aita, T. Tsukazaki, S. Hayashi, P. Hegemann, A. D. Maturana, R. Ishitani, K. Deisseroth, and O. Nureki, "Crystal structure of the channelrhodopsin light-gated cation channel," *Nature*, vol. 482, pp. 369–374, 2012.
- [8] C. Bamann, T. Kirsch, G. Nagel, and E. Bamberg, "Spectral characteristics of the photocycle of channelrhodopsin-2 and its implication for channel function," *J. Mol. Biol.*, vol. 375, pp. 686–694, 2008.
- [9] K. Welke, J. S. Frähmcke, H. C. Watanabe, P. Hegemann, and M. Elstner, "Color tuning in binding pocket models of the *chlamydomonas*-type channelrhodopsins," *J. Phys. Chem. B*, vol. 115, pp. 15119–15128, 2011.
- [10] L. Lasogga, W. Rettig, H. Otto, I. Wallat, and J. Bricks, "Model systems for the investigation of the opsin shift in bacteriorhodopsin," *J. Phys. Chem. A*, vol. 114, pp. 2179–2188, 2010.
- [11] E. Ritter, K. Stehfest, A. Berndt, P. Hegemann, and F. J. Bartl, "Monitoring light-induced structural changes of Channelrhodopsin-2 by UV-visible and Fourier transform infrared spectroscopy," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, pp. 35033–35041, 2008.

## 9. Literaturverzeichnis

- [12] E. Bamberg, "Retinal proteins light-gated ion channels and light-driven ion pumps and their application in neuro and cell biology." [Online]. Available: <http://www.biophys.mpg.de/en/bamberg.html>. [Accessed: 20-Oct-2013].
- [13] M. Nack, I. Radu, M. Gossing, C. Bamann, E. Bamberg, G. F. von Mollard, and J. Heberle, "The DC gate in Channelrhodopsin-2: crucial hydrogen bonding interaction between C128 and D156.," *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 9, pp. 194–198, 2010.
- [14] A. Bi, J. Cui, Y.-P. Ma, E. Olshevskaya, M. Pu, A. M. Dizhoor, and Z.-H. Pan, "Ectopic expression of a microbial-type rhodopsin restores visual responses in mice with photoreceptor degeneration.," *Neuron*, vol. 50, pp. 23–33, 2006.
- [15] E. S. Boyden, F. Zhang, E. Bamberg, G. Nagel, and K. Deisseroth, "Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity.," *Nat. Neurosci.*, vol. 8, pp. 1263–1268, 2005.
- [16] M. Brauner, J. Liewald, G. Nagel, and A. Gottschalk, "Exogenous Stimulation of Muscles and Neurons via Photoactivation of Channelrhodopsin-2 Triggers Rapid Behavioural Responses," *Neuronal Dev. Synaptic Funct. Behav. Meet.*, 2006.
- [17] Y. Matsui, K. Sakai, M. Murakami, Y. Shiro, S. Adachi, H. Okumura, and T. Kouyama, "Specific Damage Induced by X-ray Radiation and Structural Changes in the Primary Photoreaction of Bacteriorhodopsin," *J. Mol. Biol.*, vol. 324, pp. 469–481, 2002.
- [18] J. K. Lanyi, "Proton transfers in the bacteriorhodopsin photocycle.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1757, pp. 1012–1018, 2006.
- [19] M. Garavelli and P. Celani, "The C5H6NH2+ protonated Schiff base: An ab initio minimal model for retinal photoisomerization," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 119, pp. 6891–6901, 1997.
- [20] R. González-Luque, M. Garavelli, F. Bernardi, M. Merchán, M. A. Robb, and M. Olivucci, "Computational evidence in favor of a two-state, two-mode model of the retinal chromophore photoisomerization.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, pp. 9379–9384, 2000.
- [21] A. Strambi, P. B. Coto, L. M. Frutos, N. Ferré, and M. Olivucci, "Relationship between the excited state relaxation paths of rhodopsin and isorhodopsin.," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 130, pp. 3382–3388, 2008.
- [22] P. Hegemann, W. Gärtner, and R. Uhl, "All-trans retinal constitutes the functional chromophore in Chlamydomonas rhodopsin.," *Biophys. J.*, vol. 60, pp. 1477–1489, 1991.
- [23] M. Kamiya, H. E. Kato, R. Ishitani, O. Nureki, and S. Hayashi, "Structural and spectral characterizations of C1C2 channelrhodopsin and its mutants by molecular simulations," *Chem. Phys. Lett.*, vol. 556, pp. 266–271, 2013.

## 9. Literaturverzeichnis

- [24] L. O. Björn, *Photobiology: The Science of Life and Light*, 2nd ed. New York: Springer, 2009.
- [25] J. Krutmann, H. Hönigsmann, and C. A. Elmets, *Dermatological Phototherapy and Photodiagnostic Methods*. New York: Springer, 2008.
- [26] V. Balzani, A. Credi, and M. Venturi, "Photochemical conversion of solar energy.," *ChemSusChem*, vol. 1, pp. 26–58, 2008.
- [27] B. Wardle, *Principles and Applications of Photochemistry*, 1st ed. Chichester, West Sussex: John Wiley & Sons, 2009.
- [28] C. Marian, "Photochemie und Photophysik auf dem Computer – Brauchen wir noch Experimente?," *Jahrbuch der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*, 2004.
- [29] M. Hesse, H. Meier, and B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 8th ed. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 2012.
- [30] A. Szabo and N. S. Ostlund, *Modern Quantum Chemistry: Introduction to Advanced Electronic Structure Theory (Dover Books on Chemistry)*. New Jersey: Dover Publications, 1996.
- [31] J. Reinhold, *Quantentheorie der Moleküle*. Wiesbaden: Vieweg+Teubner Verlag, 2004.
- [32] F. Jensen, *Introduction to Computational Chemistry*. New Jersey: John Wiley & Sons, 1999.
- [33] A. Leach, *Molecular Modelling: Principles and Applications* 2nd ed. New Jersey: Prentice Hall, 2001.
- [34] H. Bernhard Schlegel, "Estimating the hessian for gradient-type geometry optimizations," *Theor. Chim. Acta*, vol. 66, pp. 333–340, 1984.
- [35] F. Robb, M. A., Garavelli, M., Olivucci, M. and Bernardi, "A Computational Strategy for Organic Photochemistry," *Rev. Comput. Chem.*, vol. 15, pp. 87-146, 2000.
- [36] D. R. Yarkony, "Nuclear dynamics near conical intersections in the adiabatic representation: I. The effects of local topography on interstate transitions," *J. Chem. Phys.*, vol. 114, pp. 2601-2613, 2001.
- [37] J. B. Foresman and Ae. Frisch, *Exploring Chemistry With Electronic Structure Methods: A Guide to Using Gaussian*. Gaussian, 1996.
- [38] B. O. Roos, "The Complete Active Space Self-Consistent Field Method and its Applications in Electronic Structure Calculations," in *Advances in Chemical Physics*, vol. 69, pp. 399–445, 1987

## 9. Literaturverzeichnis

- [39] B. Roos and P.-O. Widmark, *European Summerschool in Quantum Chemistry, Book I*. Lund: University of Lund, 2000.
- [40] J. Finley, O. Roos, and L. Serrano-andres, "The multi-state CASPT2 method," *Chem. Phys. Lett.*, vol. 288, pp. 299–306, 1998.
- [41] C. Marian, Skript zur Vorlesung: "Quantum Chemical Methods for Electronically Excited States," 2013,
- [42] S. Grimme and M. Waletzke, "A combination of Kohn–Sham density functional theory and multi-reference configuration interaction methods," *J. Chem. Phys.*, vol. 111, pp. 5645-5655, 1999.
- [43] W. D. Cornell, P. Cieplak, C. I. Bayly, I. R. Gould, K. M. Merz, D. M. Ferguson, D. C. Spellmeyer, T. Fox, J. W. Caldwell, and P. a. Kollman, "A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 117, pp. 5179–5197, 1995.
- [44] K. Lindorff-Larsen, S. Piana, K. Palmo, P. Maragakis, J. L. Klepeis, R. O. Dror, and D. E. Shaw, "Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field.," *Proteins*, vol. 78, pp. 1950–1958, 2010.
- [45] V. Hornak, R. Abel, A. Okur, B. Strockbine, A. Roitberg, and C. Simmerling, "Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters.," *Proteins*, vol. 65, pp. 712–725, 2006.
- [46] D. A. Case, T. Cheatham, T. Darden, H. Gohlke, R. Luo, K. M. Merz, Jr., A. Onufriev, C. Simmerling, B. Wang, and R. Woods, "The Amber biomolecular simulation programs," *J. Comput. Chem.*, vol. 26, pp. 1668–1688, 2005.
- [47] S. Pearlman, D.A. Case, J.W. Caldwell, W.S. Ross, T.E. Cheatham, III, DeBolt, D. Ferguson, G. Seibel, and P. Kollman, "AMBER, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to simulate the structural and energetic properties of molecules," *Comput. Physic Commun.*, vol. 91, pp. 1–41, 1995.
- [48] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, and D. J. Sonnenb, "Gaussian." Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
- [49] P. Sherwood, A. de Vries, M. Guest, G. Schreckenbach, C. Catlow, S. French, A. Sokol, S. Bromley, W. Thiel, A. Turner, S. Billeter, F. Terstegen, S. Thiel, J. Kendrick, S. Rogers, J. Casci, M. Watson, F. King, E. Karlsen, M. Sjøvoll, A. Fahmi, A. Schafer, and C. Lennartz, "QUASI: A general purpose implementation of the QM/MM approach and its application to problems in catalysis," *J. Mol Struct.*, vol.632, pp. 1-28, 2003.
- [50] P. Altoe, M. Stenta, M. Garavelli, A. Bottoni, and O. Weingart, "COBRAMM." Department of Chemistry "G.Ciamician" of the University of Bologna.

## 9. Literaturverzeichnis

- [51] P. Altoè, M. Stenta, A. Bottoni, and M. Garavelli, "A tunable QM/MM approach to chemical reactivity, structure and physico-chemical properties prediction," *Theor. Chem. Acc.*, vol. 118, pp. 219–240, 2007.
- [52] H. M. Senn and W. Thiel, "QM/MM-Methoden für biomolekulare Systeme," *Angew. Chemie*, vol. 121, pp. 1220–1254, 2009.
- [53] D. A. Case, T. A. Darden, T. I. Cheatham, C. L. Simmerling, J. Wang, R. E. Duke, R. Luo, K. M. Merz, B. Wang, D. A. Pearlman, M. Crowley, S. Brozell, S. Tsui, H. Gohlke, J. Mongan, V. Hornak, G. Cui, P. Beroza, C. Schafmeister, J. W. Caldwell, W. S. Ross, and P. A. Kollman, "Amber8." University of California, San Francisco, 2004.
- [54] D. A. Case, T. A. Darden, T. I. Cheatham, C. L. Simmerling, J. Wang, R. E. Duke, R. Luo, R. C. Walker, W. Zhang, K. M. Merz, B. Roberts, B. Wang, S. Hayik, A. Roitberg, G. Seabra, I. Kolossvary, K. F. Wong, F. Paesani, J. Vanicek, J. Liu, X. Wu, S. R. Brozell, T. Steinbrecher, H. Gohlke, Q. Cai, X. Ye, M.-J. Hsieh, G. Cui, D. R. Roe, D. H. Mathews, M. G. Seetin, C. Sagui, V. Babin, T. Luchko, S. Gusarov, A. Kovalenko, and P. A. Kollman, "Amber 11." University of California, San Francisco, 2010.
- [55] B. N. Dolinsky TJ, Czodrowski P, Li H, Nielsen JE, Jensen JH, Klebe G, "PDB2PQR: Expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations," *Nucleic Acids Res*, vol. 35, pp. 522–525, 2007.
- [56] B. N. Dolinsky TJ, Nielsen JE, McCammon JA, "PDB2PQR: an automated pipeline for the setup, execution, and analysis of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations," *Nucleic Acids Res*, vol. 32, pp. 665–667, 2004.
- [57] M. H. M. Olsson, C. R. Sondergard, M. Rostkowski, and J. H. Jensen, "PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pKa predictions," *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 7, pp. 525–537, 2011.
- [58] L. Hui, D. A. Robertson, and J. H. Jensen, "Very Fast Empirical Prediction and Interpretation of Protein pKa Values," *Proteins*, vol. 61, pp. 704–721, 2005.
- [59] C. R. Sondergard, M. H. M. Olsson, M. Rostkowski, and J. H. Jensen, "Improved Treatment of Ligands and Coupling Effects in Empirical Calculation and Rationalization of pKa Values," *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 7, pp. 2284–2295, 2011.
- [60] D. C. Bas, D. M. Rogers, and J. H. Jensen, "Very Fast Prediction and Rationalization of pKa Values for Protein-Ligand Complexes," *Proteins*, vol. 73, pp. 765–783, 2008.
- [61] G. Schaftehaar and J. Noordik, "Molden: a pre- and post-processing program for molecular and electronic structures," *J Comput Aided Mol Des*, vol. 14, pp. 123–134, 2000.

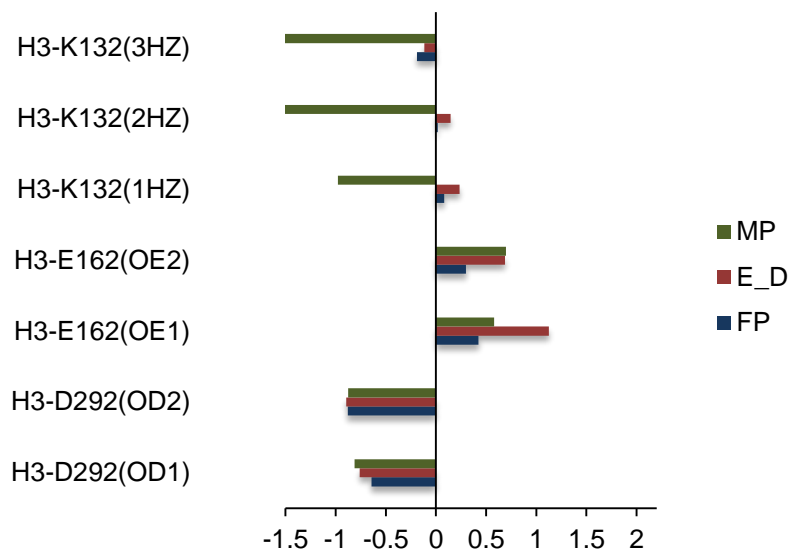
## 9. Literaturverzeichnis

- [62] U. C. Singh and P. A. Kollman, "An approach to computing electrostatic charges for molecules," *J. Comput. Chem.*, vol. 5, pp. 129–145, 1984.
- [63] H. J. Werner, P. J. Knowles, G. Knizia, F. R. Manby, M. Schütz, and E. Al., "MOLPRO, version 2010.1, a package of ab initio programs." 2010.
- [64] P. A. M. Dirac, "Quantum Mechanics of Many-Electron Systems," *Proc. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.*, vol. 123, pp. 714–733, 1929.
- [65] J. Slater, "A Simplification of the Hartree-Fock Method," *Phys. Rev.*, vol. 81, pp. 385–390, 1951.
- [66] A. Becke, "Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior.," *Phys. Rev. A*, vol. 38, pp. 3098–3100, 1988.
- [67] C. Lee, W. Yang, and R. G. Parr, "Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density," *Phys. Rev. B*, vol. 37, pp. 785–789, 1988.
- [68] A. D. Becke, "Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange," *J. Chem. Phys.*, vol. 98, pp. 5648-5652, 1993.
- [69] P. C. Hariharan and J. A. Pople, "The influence of polarization functions on molecular orbital hydrogenation energies," *Theor. Chim. Acta*, vol. 28, pp. 213–222, 1973.
- [70] G. Karlstrom, R. Lindh, P. A. Malmqvist, B. A. Roos, U. Ryde, V. Veryazov, P.-O. Widmark, M. Cossi, B. Schimmelpfennig, P. Neogrady, and L. Seijo, "Molcas: a program package for computational chemistry," *Comput. Mater. Sci.*, vol. 28, pp. 222-239, 2003.
- [71] "TURBOMOLE." a development of University of Karlsruhe and Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, 1989-2007, TURBOMOLE GmbH, since 2007, 2012.
- [72] F. Weigend, M. Häser, H. Patzelt, and R. Ahlrichs, "RI-MP2: Optimized Auxiliary Basis Sets and Demonstration of Efficiency," *Chem. Phys. Lett.*, vol. 294, pp. 143-152, 1998.
- [73] A. D. Becke, "A new mixing of Hartree–Fock and local density-functional theories," *J. Chem. Phys.*, vol. 98, pp. 1372-1377, Jan. 1993.
- [74] T. Andruniów, N. Ferré, and M. Olivucci, "Structure, initial excited-state relaxation, and energy storage of rhodopsin resolved at the multiconfigurational perturbation theory level.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, pp. 17908–17913, 2004.
- [75] D. Polli, P. Altoè, O. Weingart, K. M. Spillane, C. Manzoni, D. Brida, G. Tomasello, G. Orlandi, P. Kukura, R. a Mathies, M. Garavelli, and G. Cerullo, "Conical intersection dynamics of the primary photoisomerization event in vision.," *Nature*, vol. 467, pp. 440–443, 2010.

## Anhang

## A 1 QM/MM-Geometrieoptimierungen im Grundzustand und Charakterisierung der Zustände-Standard-Protonierung

a)



b)

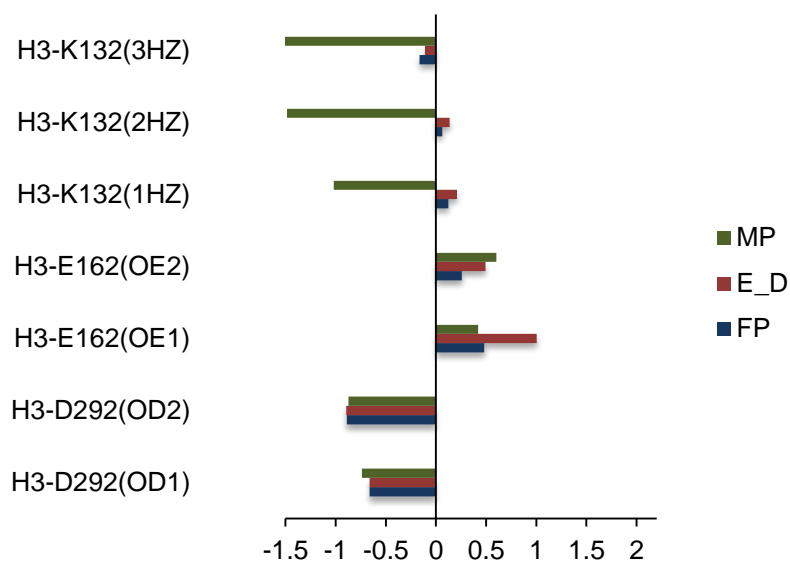
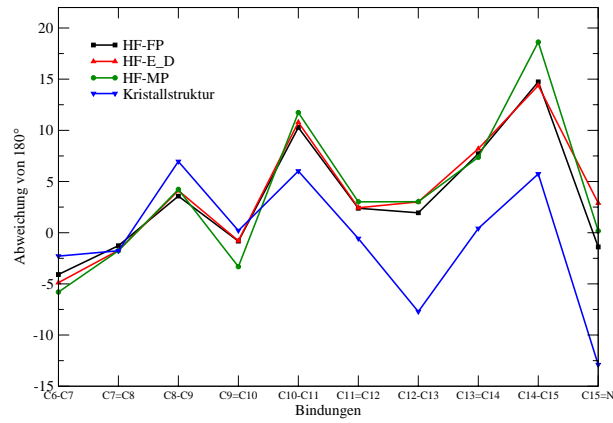


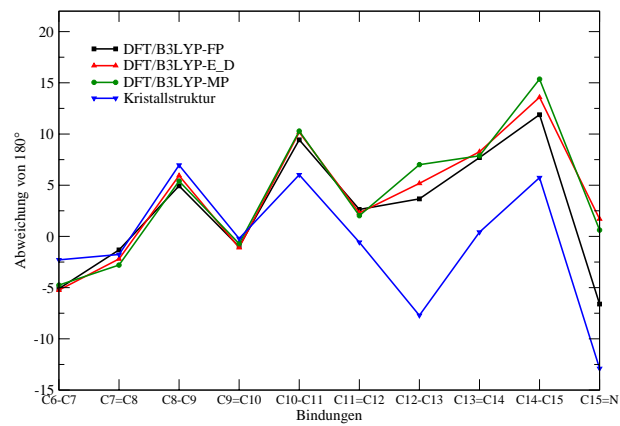
Abbildung A 1-1: Differenz der Abstände zur Kristallstruktur ( $\Delta d$ ) für FP- (blau), E\_D- (braun) und MP-Modelle im Rahmen der a) DFT/B3LYP-Geometrieoptimierung und b) CASSCF-Optimierung in der Standard-Protonierung. Die Abstände entsprechen der Darstellung in Abbildung 4-2.

# Anhang

a)



b)



c)

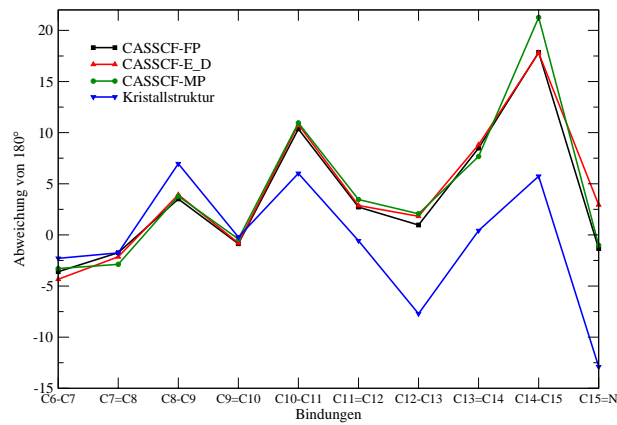
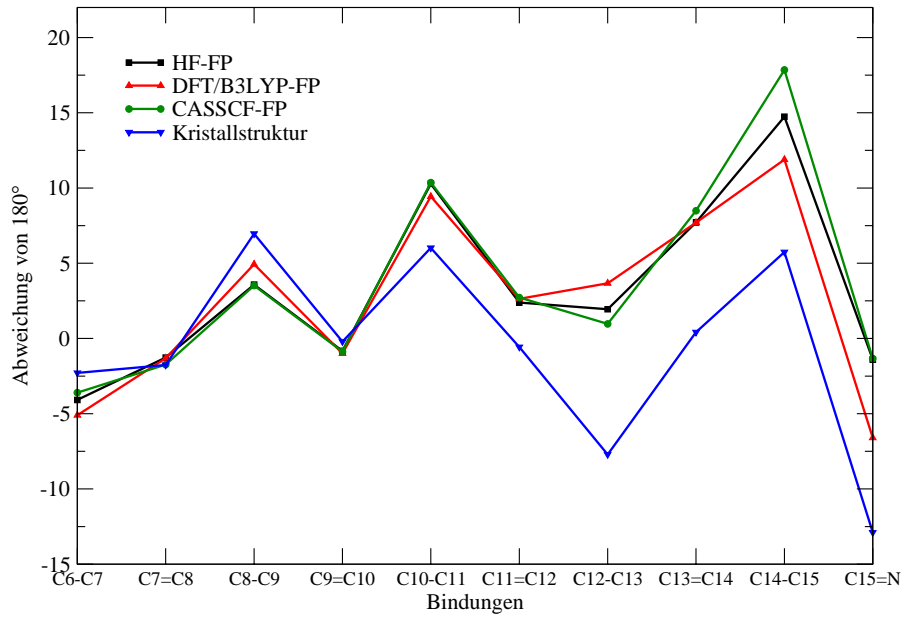


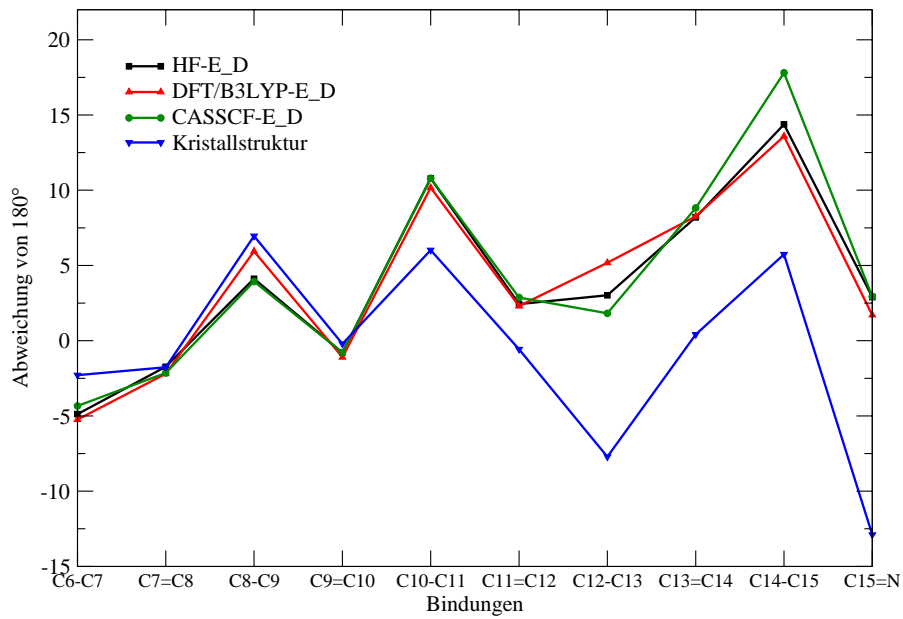
Abbildung A 1-2: Diederwinkelanalyse für HF-, DFT/B3LYP- und CASSCF-optimierten FP-, E\_D- und MP-Modelle.

## Anhang

a)



b)



**Abbildung A 1-3: Diederwinkelanalyse für a) FP-Modell bzw. b) E\_D-Modell nach jeweils HF-, DFT/B3LYP und CASSCF-Optimierungen.**

**HF-optimierte Geometrie**

**Tabelle A 1-1: Berechnete absolute CASSCF und SS/MS-CASPT2 Energien in [Hartree] sowie zugeordnete Zustände für FP-, E\_D- und MP-Modelle der HF-optimierten Geometrie in der Standard-Protonierung.**

	Zust.	$E_{\text{CASSCF}}$	Zust.	$E_{\text{SS-CASPT2}}$	Zust.	$E_{\text{MS-CASPT2}}$
<b>FP</b>	S <sub>0</sub>	-868.340053	S <sub>0</sub>	-871.066202	S <sub>0</sub>	-871.071512
	S <sub>1</sub>	-868.171941	S <sub>1</sub>	-870.929696	S <sub>1</sub>	-870.973173
	S <sub>2</sub>	-868.141702	S <sub>3</sub>	-870.918292	S <sub>2</sub>	-870.916250
	S <sub>3</sub>	-868.130308	S <sub>2</sub>	-870.924812	S <sub>3</sub>	-870.878505
	S <sub>4</sub>	-868.108407	S <sub>4</sub>	-870.865516	S <sub>4</sub>	-870.865078
<b>E_D</b>	S <sub>0</sub>	-868.327282	S <sub>0</sub>	-871.055109	S <sub>0</sub>	-871.061794
	S <sub>1</sub>	-868.161725	S <sub>1</sub>	-870.923612	S <sub>1</sub>	-870.968052
	S <sub>2</sub>	-868.132570	S <sub>2</sub>	-870.920986	S <sub>2</sub>	-870.905803
	S <sub>3</sub>	-868.122233	S <sub>3</sub>	-870.904955	S <sub>3</sub>	-870.869226
	S <sub>4</sub>	-868.096967	S <sub>4</sub>	-870.855997	S <sub>4</sub>	-870.855784
<b>MP</b>	S <sub>0</sub>	-868.339324	S <sub>0</sub>	-871.064531	S <sub>0</sub>	-871.069190
	S <sub>1</sub>	-868.169843	S <sub>1</sub>	-870.926336	S <sub>1</sub>	-870.969552
	S <sub>2</sub>	-868.140048	S <sub>3</sub>	-870.913923	S <sub>2</sub>	-870.914037
	S <sub>3</sub>	-868.126954	S <sub>2</sub>	-870.923696	S <sub>3</sub>	-870.876552
	S <sub>4</sub>	-868.107139	S <sub>4</sub>	-870.863741	S <sub>4</sub>	-870.862897

Tabelle A 1-2: Berechnete CASSCF und SS/MS-CASPT2 Energien\* und Oszillatorenstärken so wie zugeordnete Zustände für FP-,E\_D- und MP-Modelle der HF-optimierten Geometrie in der Standard-Protonierung.

Modell	Zust.	E <sub>CASSCF</sub>	f	Zust.	E <sub>SS-CASPT2</sub>	Zust.	E <sub>MS-CASPT2</sub>	f
<b>FP</b>	S <sub>0</sub>	-868.340053	-	S <sub>0</sub>	-871.066202	S <sub>0</sub>	-871.071512	-
	S <sub>1</sub>	4.5746 (271)	0.72×10 <sup>-1</sup>	S <sub>1</sub>	3.7145 (334)	S <sub>1</sub>	2.6759 (463)	1.22
	S <sub>2</sub>	5.3974 (230)	0.50	S <sub>3</sub>	4.0248 (308)	S <sub>2</sub>	4.2249 (293)	0.10
	S <sub>3</sub>	5.7075 (217)	1.32	S <sub>2</sub>	3.8474 (322)	S <sub>3</sub>	5.2520 (236)	0.94×10 <sup>-1</sup>
	S <sub>4</sub>	6.3034 (197)	0.13×10 <sup>-1</sup>	S <sub>4</sub>	5.4609 (227)	S <sub>4</sub>	5.6173 (221)	0.39×10 <sup>-3</sup>
<b>E_D</b>	S <sub>0</sub>	-868.327282	-	S <sub>0</sub>	-871.055109	S <sub>0</sub>	-871.061794	-
	S <sub>1</sub>	4.5050 (275)	0.11	S <sub>1</sub>	3.5782 (347)	S <sub>1</sub>	2.5508 (486)	1.27
	S <sub>2</sub>	5.2984 (234)	0.87	S <sub>2</sub>	3.6497 (340)	S <sub>2</sub>	4.2447 (292)	0.12
	S <sub>3</sub>	5.5797 (222)	0.83	S <sub>3</sub>	4.0859 (303)	S <sub>3</sub>	5.2400 (237)	0.17×10 <sup>-1</sup>
	S <sub>4</sub>	6.2672 (198)	0.86×10 <sup>-2</sup>	S <sub>4</sub>	5.4181 (229)	S <sub>4</sub>	5.6058 (222)	0.12×10 <sup>-2</sup>
<b>MP</b>	S <sub>0</sub>	-868.339324	-	S <sub>0</sub>	-871.064531	S <sub>0</sub>	-871.069190	-
	S <sub>1</sub>	4.6118 (267)	0.63×10 <sup>-1</sup>	S <sub>1</sub>	3.7605 (330)	S <sub>1</sub>	2.7113 (458)	1.18
	S <sub>2</sub>	5.4226 (229)	0.43	S <sub>3</sub>	4.0983 (303)	S <sub>2</sub>	4.2219 (294)	0.94 ×10 <sup>-1</sup>
	S <sub>3</sub>	5.7789 (133)	1.40	S <sub>2</sub>	3.8323 (323)	S <sub>3</sub>	5.2419 (236)	0.11
	S <sub>4</sub>	6.3181 (196)	0.21×10 <sup>-1</sup>	S <sub>4</sub>	5.4638 (227)	S <sub>4</sub>	5.6135 (221)	0.71×10 <sup>-3</sup>

\*Für S<sub>0</sub> Zustände Energien in Hartree, für S<sub>1</sub>-S<sub>4</sub> Zustände relative Energien in eV und nm in Klammern.

**DFT/B3LYP-optimierte Geometrie**

Tabelle A 1-3: Berechnete absolute CASSCF und SS/MS-CASPT2 Energien in [Hartree] sowie zugeordnete Zustände für FP-, E\_D- und MP-Modelle der DFT/B3LYP-optimierten Geometrie in der Standard-Protonierung.

Modell	Zust.	$E_{\text{CASSCF}}$	Zust.	$E_{\text{SS-CASPT2}}$	Zust.	$E_{\text{MS-CASPT2}}$
<b>FP</b>	S <sub>0</sub>	-868.320054	S <sub>0</sub>	-871.068211	S <sub>0</sub>	-871.073738
	S <sub>1</sub>	-868.193955	S <sub>2</sub>	-870.959959	S <sub>1</sub>	-870.971332
	S <sub>2</sub>	-868.155336	S <sub>3</sub>	-870.925277	S <sub>2</sub>	-870.952507
	S <sub>3</sub>	-868.140631	S <sub>1</sub>	-870.964541	S <sub>3</sub>	-870.920840
	S <sub>4</sub>	-868.119334	S <sub>4</sub>	-870.889412	S <sub>4</sub>	-870.888984
<b>E_D</b>	S <sub>0</sub>	-868.306010	S <sub>0</sub>	-871.055891	S <sub>0</sub>	-871.062654
	S <sub>1</sub>	-868.181165	S <sub>2</sub>	-870.949281	S <sub>1</sub>	-870.962751
	S <sub>2</sub>	-868.142261	S <sub>3</sub>	-870.915980	S <sub>2</sub>	-870.942295
	S <sub>3</sub>	-868.134143	S <sub>1</sub>	-870.954284	S <sub>3</sub>	-870.908075
	S <sub>4</sub>	-868.106190	S <sub>4</sub>	-870.878052	S <sub>4</sub>	-870.877714
<b>MP</b>	S <sub>0</sub>	-868.315696	S <sub>0</sub>	-871.063164	S <sub>0</sub>	-871.068351
	S <sub>1</sub>	-868.188416	S <sub>2</sub>	-870.954069	S <sub>1</sub>	-870.966065
	S <sub>2</sub>	-868.150044	S <sub>3</sub>	-870.919493	S <sub>2</sub>	-870.946256
	S <sub>3</sub>	-868.134485	S <sub>1</sub>	-870.958560	S <sub>3</sub>	-870.915137
	S <sub>4</sub>	-868.114267	S <sub>4</sub>	-870.883881	S <sub>4</sub>	-870.883358

Tabelle A 1-4: Berechnete CASSCF und SS/MS-CASPT2 Energien\* und Oszillatorenstärken für FP-, E\_D- und MP-Modelle der DFT/B3LYP-optimierten Geometrie in der Standard-Protonierung.

Modell	Zust.	$E_{\text{CASSCF}}$	$f$	Zust.	$E_{\text{SS-CASPT2}}$	Zust.	$E_{\text{MS-CASPT2}}$	$f$
<b>FP</b>	S <sub>0</sub>	-868.320054	-	S <sub>0</sub>	-871.068211	S <sub>0</sub>	-871.073738	-
	S <sub>1</sub>	3.4313 (361)	$0.12 \times 10^{-1}$	S <sub>2</sub>	2.9457 (421)	S <sub>1</sub>	2.7866 (445)	1.12
	S <sub>2</sub>	4.4822 (277)	$0.26 \times 10^{-2}$	S <sub>3</sub>	3.8894 (319)	S <sub>2</sub>	3.2989 (376)	0.55
	S <sub>3</sub>	4.8824 (254)	1.92	S <sub>1</sub>	2.8210 (440)	S <sub>3</sub>	4.1606 (298)	0.11
	S <sub>4</sub>	5.4619 (126)	$0.31 \times 10^{-2}$	S <sub>4</sub>	4.8654 (255)	S <sub>4</sub>	5.0274 (247)	$0.59 \times 10^{-2}$
<b>E_D</b>	S <sub>0</sub>	-868.306010	-	S <sub>0</sub>	-871.055891	S <sub>0</sub>	-871.062654	-
	S <sub>1</sub>	3.3972 (365)	$0.16 \times 10^{-1}$	S <sub>2</sub>	2.9010 (427)	S <sub>1</sub>	2.7185 (456)	1.27
	S <sub>2</sub>	4.4558 (278)	$0.63 \times 10^{-1}$	S <sub>3</sub>	3.8072 (326)	S <sub>2</sub>	3.2751 (379)	0.45
	S <sub>3</sub>	4.6767 (265)	1.81	S <sub>1</sub>	2.7649 (448)	S <sub>3</sub>	4.2063 (295)	0.14
	S <sub>4</sub>	5.4374 (228)	$0.27 \times 10^{-2}$	S <sub>4</sub>	4.8393 (256)	S <sub>4</sub>	5.0325 (246)	$0.49 \times 10^{-2}$
<b>MP</b>	S <sub>0</sub>	-868.315696	-	S <sub>0</sub>	-871.063164	S <sub>0</sub>	-871.068351	-
	S <sub>1</sub>	3.4635 (358)	$0.13 \times 10^{-1}$	S <sub>2</sub>	2.9686 (418)	S <sub>1</sub>	2.7833 (445)	1.1
	S <sub>2</sub>	4.5076 (275)	$0.24 \times 10^{-1}$	S <sub>3</sub>	3.9095 (317)	S <sub>2</sub>	3.3224 (373)	0.52
	S <sub>3</sub>	4.9310 (251)	1.91	S <sub>1</sub>	2.8464 (436)	S <sub>3</sub>	4.1692 (297)	0.11
	S <sub>4</sub>	5.4812 (226)	$0.39 \times 10^{-2}$	S <sub>4</sub>	4.8785 (254)	S <sub>4</sub>	5.0339 (246)	$0.61 \times 10^{-2}$

\*Für S<sub>0</sub> Zustände Energien in Hartree, für S<sub>1</sub>-S<sub>4</sub> Zustände relative Energien in eV und nm in Klammern

## Anhang

**Tabelle A 1-5: SS/MS-CASPT2 Konfigurationen\* und dazugehörige Wichtungen für FP-,E\_D- und MP-Modelle der DFT/B3LYP-optimierten Geometrie in der Standard-Protonierung.**

Modell	Zust.	SS-Konfig.	Gewicht [%]	Zust.	MS-Konfig.	Gewicht [%]	
<b>FP</b>	S <sub>0</sub>	222222000000	65	S <sub>0</sub>	222222000000	72	
	S <sub>2</sub>	222220200000	28	S <sub>1</sub>	22222ud00000	37	
		2222u2d00000	16		22222u0d00000	12	
		22222u0d00000	15		S <sub>2</sub>	22222ud00000	23
	S <sub>3</sub>	222u22d00000	17	222220200000		17	
		2222ud200000	13	2222u2d00000		12	
		222220ud00000	13	S <sub>3</sub>		222u22d00000	18
	S <sub>1</sub>	22222u00d000	11		2222ud200000	17	
		S <sub>4</sub>	22u222d00000		20	S <sub>4</sub>	22u222d00000
	<b>E_D</b>	S <sub>0</sub>	222222000000	64	S <sub>0</sub>	222222000000	73
		S <sub>2</sub>	222220200000	28	S <sub>1</sub>	22222ud00000	40
			2222u2d00000	16		22222u0d00000	12
22222u0d00000			15	S <sub>2</sub>		222u22d00000	19
S <sub>3</sub>		222u22d00000	17		222220200000	18.7	
		222220ud00000	13		2222u2d00000	13	
		2222ud200000	12		S <sub>3</sub>	222u22d00000	18
S <sub>1</sub>		22222u00d000	12	2222ud200000		17	
		S <sub>4</sub>	22u222d00000	21		S <sub>4</sub>	22u222d00000
<b>MP</b>		S <sub>0</sub>	222222000000	65	S <sub>0</sub>	222222000000	72
		S <sub>2</sub>	222220200000	28	S <sub>1</sub>	22222ud00000	38
			2222u2d00000	16		22222u0d00000	12
	22222u0d00000		15	S <sub>2</sub>		222u22d00000	23
	S <sub>3</sub>	222u22d00000	17		222220200000	17	
		2222ud200000	13		2222u2d00000	12	
		222220ud00000	13		S <sub>3</sub>	222u22d00000	18
	S <sub>1</sub>	22222u00d000	12	2222ud200000		17	
		S <sub>4</sub>	22u222d00000	20		S <sub>4</sub>	22u222d00000

\*Zahl 2 entspricht einem doppelbesetzten Orbital. u und d bezeichnen eine Einfachbesetzung mit jeweils *spin up* bzw. *spin down*.

## Anhang

**Tabelle A 1-6: Berechnete DFT/MRCI Energien\*, zugeordnete Zustände, entsprechende Konfigurationen\*\* mit den dazugehörigen Wichtungen und Oszillatorenstärken für FP-, E\_D- und MP-Modelle der DFT/B3LYP-optimierten Geometrie in der Standard-Protonierung.**

Modell	Zustand	E	E <sub>abs.</sub>	Konfiguration	Gewicht [%]	f
FP	S <sub>0</sub>	-872.956815	-872.956815	GZ	91	-
	S <sub>1</sub>	2.5496 (486)	-872.863120	H→L	62	1.21
				H→L	24	
	S <sub>2</sub>	2.8883 (429)	-872.850673	H-1→L	19	1.06
				H <sup>2</sup> →L <sup>2</sup>	15	
	S <sub>3</sub>	3.6634 (338)	-872.822188	H-2→L	25	0.023
				H-1,H→L <sup>2</sup>	16	
	S <sub>4</sub>	4.1987 (295)	-872.802515	H→L+2	11	0.12
				H-1→L	38	
	E_D	S <sub>0</sub>	-872.944810	-872.944810	GZ	91
S <sub>1</sub>		2.4898 (498)	-872.853313	H→L	69	1.42
				H-1 →L	21	
S <sub>2</sub>		2.8574 (433)	-872.839803	H <sup>2</sup> →L <sup>2</sup>	18	0.84
				H→L	16	
S <sub>3</sub>		3.6485 (339)	-872.810732	H-2→L	26	0.019
				H-1,H→L <sup>2</sup>	16	
S <sub>4</sub>		4.1545 (298.4)	-872.792134	H→L+2	11	0.12
				H-1→L	39	
MP		S <sub>0</sub>	-872.951652	-872.951652	GZ	91
	S <sub>1</sub>	2.5707 (482)	-872.857179	H→L	63	1.22
				H→L	23	
	S <sub>2</sub>	2.9269 (423.6)	-872.844091	H-1→L	20	1.04
				H <sup>2</sup> →L <sup>2</sup>	15	
	S <sub>3</sub>	3.6873 (336)	-872.816147	H-2→L	25	0.026
				H-1,H→L <sup>2</sup>	16	
	S <sub>4</sub>	4.2116 (294)	-872.796878	H→L+2	11	0.13
				H-1→L	37	
					H→L+1	37

\*Energien für S<sub>0</sub> Zustände und absolute Energien (E<sub>abs.</sub>) in Hartree, für S<sub>1</sub>-S<sub>4</sub> Zustände relative Energien in eV und nm (in Klammern). \*\*Index <sup>2</sup> entspricht einer Doppelanregung.

**CASSCF-optimierte Geometrie**

Tabelle A 1-7: Berechnete absolute CASSCF und SS/MS-CASPT2 Energien in [Hartree] so wie zugeordnete Zustände für FP-, E\_D- und MP-Modelle der CASSCF-optimierten Geometrie in der Standard-Protonierung.

Modell	Zust.	$E_{\text{CASSCF}}$	Zust.	$E_{\text{SS-CASPT2}}$	Zust.	$E_{\text{MS-CASPT2}}$
<b>FP</b>	S <sub>0</sub>	-868.342964	S <sub>0</sub>	-871.069638	S <sub>0</sub>	-871.074225
	S <sub>1</sub>	-868.186443	S <sub>2</sub>	-870.939646	S <sub>1</sub>	-870.973285
	S <sub>2</sub>	-868.154517	S <sub>3</sub>	-870.917907	S <sub>2</sub>	-870.929853
	S <sub>3</sub>	-868.138054	S <sub>1</sub>	-870.943903	S <sub>3</sub>	-870.895185
	S <sub>4</sub>	-868.122887	S <sub>4</sub>	-870.877845	S <sub>4</sub>	-870.876390
<b>E_D</b>	S <sub>0</sub>	-868.331039	S <sub>0</sub>	-871.059004	S <sub>0</sub>	-871.065029
	S <sub>1</sub>	-868.175632	S <sub>1</sub>	-870.931782	S <sub>1</sub>	-870.969838
	S <sub>2</sub>	-868.144076	S <sub>3</sub>	-870.915501	S <sub>2</sub>	-870.920034
	S <sub>3</sub>	-868.130774	S <sub>2</sub>	-870.930508	S <sub>3</sub>	-870.882845
	S <sub>4</sub>	-868.111569	S <sub>4</sub>	-870.867951	S <sub>4</sub>	-870.867001
<b>MP</b>	S <sub>0</sub>	-868.344524	S <sub>0</sub>	-871.070011	S <sub>0</sub>	-871.073716
	S <sub>1</sub>	-868.186850	S <sub>2</sub>	-870.938225	S <sub>1</sub>	-870.970912
	S <sub>2</sub>	-868.155017	S <sub>3</sub>	-870.915118	S <sub>2</sub>	-870.929523
	S <sub>3</sub>	-868.135721	S <sub>1</sub>	-870.944014	S <sub>3</sub>	-870.896030
	S <sub>4</sub>	-868.123819	S <sub>4</sub>	-870.878231	S <sub>4</sub>	-870.875419

Tabelle A 1-8: Berechnete CASSCF und SS/MS-CASPT2 Energien\* und Oszillatorenstärken für FP-,E\_D- und MP-Modelle der CASSCF-optimierten Geometrie in der Standard-Protonierung.

Modell	Zust.	$E_{\text{CASSCF}}$	$f$	Zust.	$E_{\text{SS-CASPT2}}$	Zust.	$E_{\text{MS-CASPT2}}$	$f$
<b>FP</b>	S <sub>0</sub>	-868.342964	-	S <sub>0</sub>	-871.069638	S <sub>0</sub>	-871.074225	-
	S <sub>1</sub>	4.2592 (291)	$0.34 \times 10^{-1}$	S <sub>2</sub>	3.5373 (351)	S <sub>1</sub>	2.7467 (451)	1.16
	S <sub>2</sub>	5.1279 (242)	0.18	S <sub>3</sub>	4.1288 (300)	S <sub>2</sub>	3.9286 (316)	0.14
	S <sub>3</sub>	5.5759 (222)	1.64	S <sub>1</sub>	3.4214 (362)	S <sub>3</sub>	4.8719 (255)	0.17
	S <sub>4</sub>	5.9886 (207)	$0.28 \times 10^{-1}$	S <sub>4</sub>	5.2190 (238)	S <sub>4</sub>	5.3833 (230)	$0.33 \times 10^{-2}$
<b>E_D</b>	S <sub>0</sub>	-868.331039	-	S <sub>0</sub>	-871.059004	S <sub>0</sub>	-871.065029	-
	S <sub>1</sub>	4.2288 (293)	$0.50 \times 10^{-1}$	S <sub>1</sub>	3.4619 (358)	S <sub>1</sub>	2.5903 (479)	1.2
	S <sub>2</sub>	5.0875 (244)	0.34	S <sub>3</sub>	3.9049 (318)	S <sub>2</sub>	3.9455 (314)	0.13
	S <sub>3</sub>	5.4495 (228)	1.42	S <sub>2</sub>	3.4966 (355)	S <sub>3</sub>	4.9575 (250)	0.14
	S <sub>4</sub>	5.9721 (208)	$0.19 \times 10^{-1}$	S <sub>4</sub>	5.1988 (238)	S <sub>4</sub>	5.3886 (230)	$0.14 \times 10^{-2}$
<b>MP</b>	S <sub>0</sub>	-868.344524	-	S <sub>0</sub>	-871.070011	S <sub>0</sub>	-871.073716	-
	S <sub>1</sub>	4.2905 (289)	$0.27 \times 10^{-1}$	S <sub>2</sub>	3.5861 (346)	S <sub>1</sub>	2.7974 (443)	1.18
	S <sub>2</sub>	5.1567 (240)	0.13	S <sub>3</sub>	4.2149 (294)	S <sub>2</sub>	3.9237 (316)	0.12
	S <sub>3</sub>	5.6818 (218)	1.72	S <sub>1</sub>	3.4286 (362)	S <sub>3</sub>	4.8351 (256)	0.16
	S <sub>4</sub>	6.0057 (206)	$0.46 \times 10^{-1}$	S <sub>4</sub>	5.2186 (238)	S <sub>4</sub>	5.3959 (230)	$2.3 \times 10^{-3}$

\*Für S<sub>0</sub> Zustände Energien in Hartree, für S<sub>1</sub>-S<sub>4</sub> Zustände relative Energien in eV und nm (in Klammern)

## Anhang

**Tabelle A 1-9: SS/MS-CASPT2 Konfigurationen\* und dazugehörige Wichtungen [%] für FP-, E\_D- und MP-Modelle der CASSCF-optimierten Geometrie in der Standard-Protonierung.**

Modell	Zust.	SS-Konfig.	Gewicht [%]	Zust.	MS-Konfig.	Gewicht [%]
<b>FP</b>	S <sub>0</sub>	222222000000	69	S <sub>0</sub>	222222000000	72
	S <sub>2</sub>	222220200000	27	S <sub>1</sub>	22222ud00000	54
		22222u0d0000	15			
	S <sub>3</sub>	2222u2d00000	14	S <sub>2</sub>	222220200000	23
		222220ud0000	13			
		22222u0d0000	12			
		222u22d00000	14			
	S <sub>1</sub>	22222ud00000	53	S <sub>3</sub>	222u22d00000	17.4
	S <sub>4</sub>	2222ud200000	17	S <sub>4</sub>	22u222d00000	19
		22u222d00000	20			
<b>E_D</b>	S <sub>0</sub>	222222000000	69	S <sub>0</sub>	222222000000	73
	S <sub>1</sub>	222220200000	27	S <sub>1</sub>	22222ud00000	54
		22222u0d0000	15			
	S <sub>3</sub>	22222ud00000	14	S <sub>2</sub>	222220200000	24
		222220ud0000	13			
		222u22d00000	12			
		22222u0d0000	12			
	S <sub>2</sub>	22222ud00000	46	S <sub>3</sub>	222u22d00000	18
		2222ud200000	10		2222ud200000	16
	S <sub>4</sub>	22u222d00000	20	S <sub>4</sub>	22u222d00000	19
<b>MP</b>	S <sub>0</sub>	222222000000	69	S <sub>0</sub>	222222000000	72
	S <sub>2</sub>	222220200000	27	S <sub>1</sub>	22222ud00000	54
		22222u0d0000	15			
	S <sub>3</sub>	2222u2d00000	14	S <sub>2</sub>	222220200000	23
		222u22d00000	15			
		222220ud0000	13			
		22222u0d0000	12			
	S <sub>1</sub>	22222ud00000	56	S <sub>3</sub>	222u22d00000	17
	S <sub>4</sub>	2222ud200000	17	S <sub>4</sub>	22u222d00000	19
		22u222d00000	20			

\*Zahl 2 entspricht einem doppelbesetzten Orbital. u und d bezeichnen eine Einfachbesetzung mit jeweils *spin up* bzw. *spin down*.

## Anhang

**Tabelle A 1-10: Berechnete DFT/MRCI Energien\*, zugeordnete Zustände, entsprechende Konfigurationen mit den dazugehörigen Wichtungen und Oszillatorenstärken für FP-, E\_D- und MP-Modelle der CASSCF-optimierten Geometrie in der Standard-Protonierung.**

Modell	Zustand	E	E <sub>abs.</sub>	Konfiguration	Gewicht [%]	f
<b>FP</b>	S <sub>0</sub>	-872.955622	-872.955622	GZ	93	
	S <sub>1</sub>	2.8271 (439)	-872.851727	H→L	81	1.47
	S <sub>2</sub>	3.5398 (350)	-872.825538	H-1 →L	34	0.60
				H→L+1	12	
	S <sub>3</sub>	4.1534 (299)	-872.802988	H→L+1	25	0.23
				H-1→L	15	
S <sub>4</sub>	4.4816 (277)	-872.790926	H-2→L	11	0.075	
			H→L+1	25		
<b>E_D</b>	S <sub>0</sub>	-872.945224	-872.945224	GZ	93	
	S <sub>1</sub>	2.7403 (452)	-872.844520	H→L	82	1.47
	S <sub>2</sub>	3.5219 (352)	-872.815795	H-1→L	37	0.56
				H→L+1	10	
	S <sub>3</sub>	4.1282 (300)	-872.793514	H→L+1	28	0.25
				H-1→L	15	
S <sub>4</sub>	4.4623 (277.8)	-872.781238	H-2→L	11	0.076	
			H→L+1	26		
<b>MP</b>	S <sub>0</sub>	-872.955699	-872.955699	GZ	93	
	S <sub>1</sub>	2.8825 (430)	-872.849768	H→L	80	1.44
	S <sub>2</sub>	3.5571 (349)	-872.824979	H-1 →L	32	0.62
				H→L+1	13	
	S <sub>3</sub>	4.1696 (297)	-872.802468	H→L+1	27	0.25
				H-1→L	15	
S <sub>4</sub>	4.4895 (276)	-872.790714	H-2→L	11	0.066	
			H→L+1	26		
			H-1→L	13		

\*Energien für S<sub>0</sub> Zustände und absolute Energien (E<sub>abs.</sub>) in Hartree, für S<sub>1</sub>-S<sub>4</sub> Zustände relative Energien in eV und nm (in Klammern).

## Berechnung der Energien im Vakuum

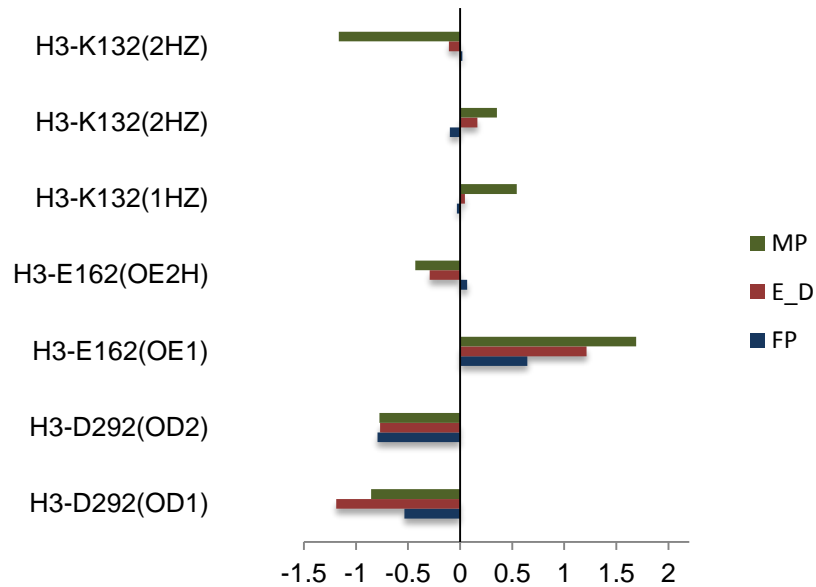
Tabelle A 1-11: SS/MS-CASPT2-Energien im Vakuum für HF-, DFT/B3LYP und CASSCF-optimierte Geometrien in der Standard-Protonierung.

SS			
Zust.	HF	DFT/B3LYP	CASSCF
S <sub>0</sub>	-870.912152	-870.920858	-870.914799
S <sub>1</sub>	2.1014 (590)	1.8598 (667)	1.9923 (622)
S <sub>2</sub>	3.3298 (372)	2.7506 (451)	3.1885 (389)
S <sub>3</sub>	3.8179 (325)	3.5203 (352)	3.6608 (339)
S <sub>4</sub>	4.3565 (285)	3.8054 (326)	4.0963 (303)
MS			
S <sub>0</sub>	-870.914927	-870.925073	-870.918290
S <sub>1</sub>	2.1696 (571)	2.0109 (617)	2.0906 (593)
S <sub>2</sub>	3.2598 (380)	2.8031 (442)	3.1121 (398)
S <sub>3</sub>	3.9916 (311)	3.5321 (351)	3.8201 (325)
S <sub>4</sub>	4.5621 (272)	4.1635 (298)	4.3908 (282)

\*Für S<sub>0</sub> Zustände Energien in Hartree, für S<sub>1</sub>-S<sub>4</sub> Zustände relative Energien in eV und nm in Klammern

## A 2 QM/MM-Geometrieoptimierungen im Grundzustand und Charakterisierung der Zustände-GLH162-Struktur

a)



b)

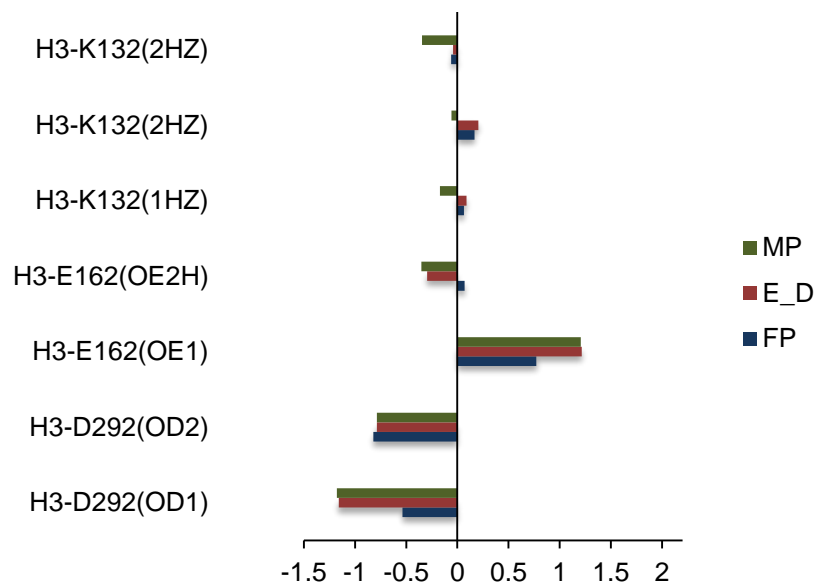
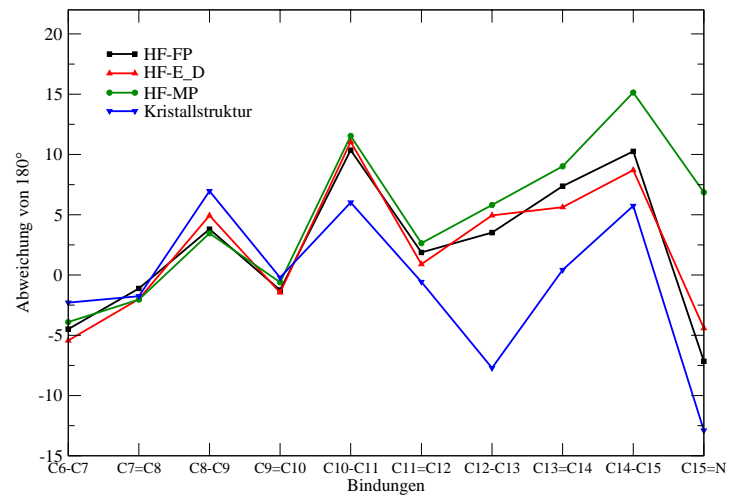


Abbildung A 2-1: Differenz der Abstände zur Kristallstruktur ( $\Delta d$ ) für FP- (blau), E\_D- (braun) und MP-Modelle im Rahmen der a) DFT/B3LYP-Geometrieoptimierung und b) CASSCF-Optimierung in der GLH162-Protonierung. Die Abstände entsprechen der Darstellung in Abbildung 4-2, zur näheren Beschreibung s. Kapitel 4.1.4.

## Anhang

a)



b)

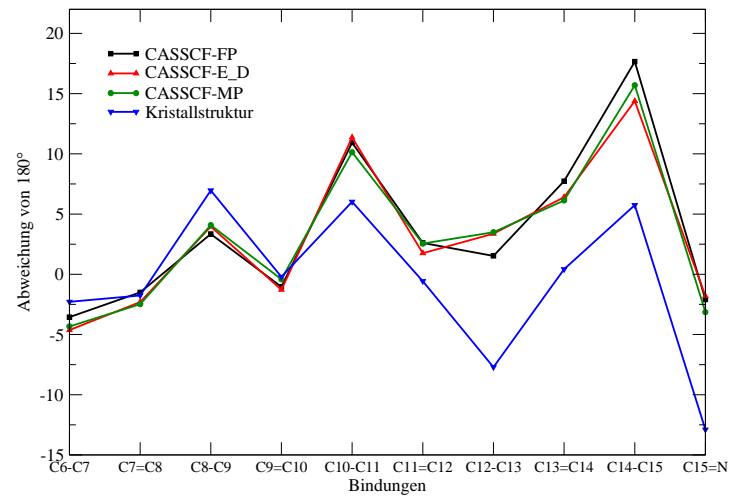


Abbildung A 2-2: Diederwinkelanalyse für a) HF- und b) CASSCF- optimierte FP-, E\_D- und MP- Modelle.

## Anhang

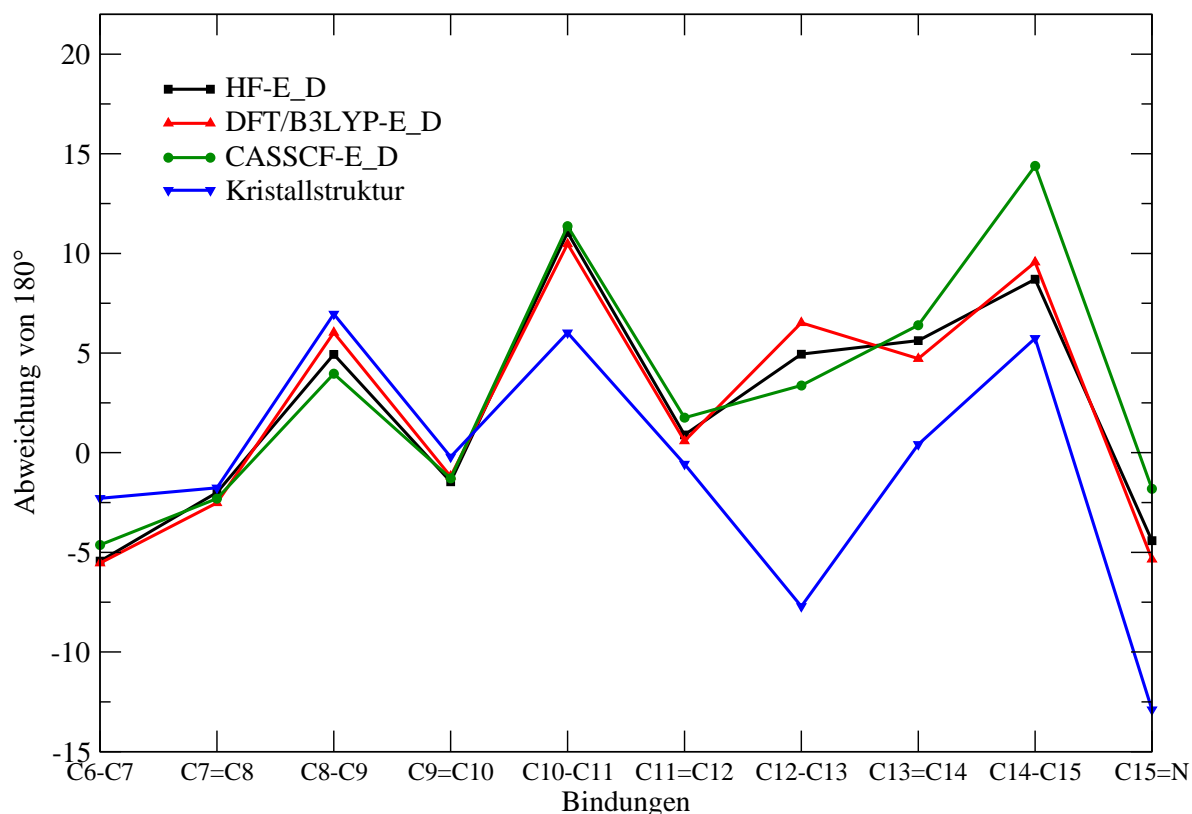


Abbildung A 2-3: Diederwinkelanalyse für das E\_D-Modell nach jeweils HF-, DFT/B3LYP und CASSCF-Optimierungen.

### HF-optimierte Geometrie

Tabelle A 2-1: Berechnete absolute CASSCF und SS/MS-CASPT2 Energien in [Hartree] so wie zugeordnete Zustände für FP-, E\_D- und MP-Modelle der HF-optimierten Geometrie in der GLH162-Struktur.

Modell	Zust.	$E_{\text{CASSCF}}$		$E_{\text{SS-CASPT2}}$		$E_{\text{MS-CASPT2}}$
<b>FP</b>	S <sub>0</sub>	-868.248284	S <sub>0</sub>	-870.984802	S <sub>0</sub>	-870.992524
	S <sub>1</sub>	-868.102012	S <sub>1</sub>	-870.885495	S <sub>1</sub>	-870.899304
	S <sub>2</sub>	-868.081369	S <sub>2</sub>	-870.861846	S <sub>2</sub>	-870.841922
	S <sub>3</sub>	-868.057857	S <sub>3</sub>	-870.826808	S <sub>3</sub>	-870.825353
	S <sub>4</sub>	-868.026358	S <sub>4</sub>	-870.795247	S <sub>4</sub>	-870.795094
<b>E_D</b>	S <sub>0</sub>	-868.249427	S <sub>0</sub>	-870.985758	S <sub>0</sub>	-870.99347
	S <sub>1</sub>	-868.103197	S <sub>1</sub>	-870.886748	S <sub>1</sub>	-870.900198
	S <sub>2</sub>	-868.082248	S <sub>2</sub>	-870.862268	S <sub>2</sub>	-870.842643
	S <sub>3</sub>	-868.058867	S <sub>3</sub>	-870.827686	S <sub>3</sub>	-870.826317
	S <sub>4</sub>	-868.027461	S <sub>4</sub>	-870.796015	S <sub>4</sub>	-870.795847
<b>MP</b>	S <sub>0</sub>	-868.260898	S <sub>0</sub>	-870.994278	S <sub>0</sub>	-871.002354
	S <sub>1</sub>	-868.107482	S <sub>1</sub>	-870.885086	S <sub>1</sub>	-870.907741
	S <sub>2</sub>	-868.08528	S <sub>2</sub>	-870.873427	S <sub>2</sub>	-870.846106
	S <sub>3</sub>	-868.066519	S <sub>3</sub>	-870.832671	S <sub>3</sub>	-870.829371
	S <sub>4</sub>	-868.03594	S <sub>4</sub>	-870.801139	S <sub>4</sub>	-870.80103

## Anhang

**Tabelle A 2-2: Berechnete MS-CASPT2 Energien\*, Oszillatorenstärken, entsprechende Konfigurationen\*\* mit dazugehörigen Gewichten für FP-, E\_D- und MP-Modelle der HF-optimierten Geometrie in der GLH162-Protonierung.**

Modell	Zust.	$E_{\text{MS-CASPT2}}$	$f$	Konfiguration	Gewicht [%]
<b>FP</b>	S <sub>0</sub>	-870.992524	-	222222000000	76
	S <sub>1</sub>	2.5366 (489)	1.63	22222ud00000	58
	S <sub>2</sub>	4.0981 (303)	0.13	222220200000	27
				2222u2d00000	19
	S <sub>3</sub>	4.5490 (273)	$0.3 \times 10^{-2}$	222u22d00000	21
				2222ud200000	13
S <sub>4</sub>	5.3724 (231)	$0.84 \times 10^{-3}$	22u222d00000	23	
<b>E_D</b>	S <sub>0</sub>	-870.993470	-	222222000000	77
	S <sub>1</sub>	2.5380 (489)	1.64	22222ud00000	58
	S <sub>2</sub>	4.1042 (302)	0.14	222220200000	27
				2222u2d00000	19
	S <sub>3</sub>	4.5485 (273)	$0.30 \times 10^{-2}$	222u22d00000	21
				2222ud200000	13
S <sub>4</sub>	5.3776 (231)	$0.83 \times 10^{-3}$	22u222d00000	23	
<b>MP</b>	S <sub>0</sub>	-871.002354	-	222222000000	76
	S <sub>1</sub>	2.5746 (482)	1.49	22222ud00000	56
	S <sub>2</sub>	4.2517 (292)	0.19	222220200000	28
				2222u2d00000	17
	S <sub>3</sub>	4.7071 (263)	$0.96 \times 10^{-3}$	222u22d00000	20
				2222ud200000	13
22222u00d000				10	
			222220ud0000	10	
S <sub>4</sub>	5.4783 (226)	$0.15 \times 10^{-2}$	22u222d00000	23	

\*Für S<sub>0</sub> Zustände Energien in Hartree, für S<sub>1</sub>-S<sub>4</sub> Zustände relative Energien in eV und nm in Klammern. \*\*Zahl 2 entspricht einem doppelbesetzten Orbital. u und d bezeichnen eine Einfachbesetzung mit jeweils *spin up* bzw. *spin down*.

## Anhang

**Tabelle A 2-3: Berechnete DFT/MRCI Energien\*, zugeordnete Zustände, entsprechende Konfigurationen\*\* mit den dazugehörigen Wichtungen und Oszillatorenstärken für FP-,E\_D- und MP-Modelle der HF-optimierten Geometrie in der GLH162-Protonierung**

Modell	Zustand	$E_{\text{DFTCI}}$	$E_{\text{abs.}}$	Konfiguration	Gewicht [%]	$f$
FP	S <sub>0</sub>	-872.875778	-872.875778	GZ	94	-
	S <sub>1</sub>	2.4082 (515)	-872.787277	H→L	85	1.62
	S <sub>2</sub>	3.4389 (361)	-872.749402	H-1→L	56	0.44
	S <sub>3</sub>	4.0422 (307)	-872.727231	H→L+1	22	0.18
				H-2→L	18	
				H-1→L	13	
	S <sub>4</sub>	4.4552 (278)	-872.712051	H-2→L	24	0.068
				H→L+1	19	
				H <sup>2</sup> →L,L+1	10	
	E_D	S <sub>0</sub>	-872.876672	-872.876672	GZ	94
S <sub>1</sub>		2.4011 (516)	-872.788433	H→L	85	1.61
S <sub>2</sub>		3.4357 (361)	-872.750413	H-1→L	56	0.45
S <sub>3</sub>		4.0374 (307)	-872.728300	H→L+1	22	0.18
				H-2→L	19	
				H-1→L	13	
S <sub>4</sub>		4.4604 (278)	-872.712756	H-2→L	23	0.069
				H→L+1	18	
				H <sup>2</sup> →L,L+1	10	
MP		S <sub>0</sub>	-872.884365	-872.884365	GZ	94
	S <sub>1</sub>	2.5168 (493)	-872.791876	H→L	85	1.58
	S <sub>2</sub>	3.5439 (350)	-872.754131	H-1→L	54	0.47
	S <sub>3</sub>	4.1325 (300)	-872.732497	H→L+1	26	0.22
				H-2→L	17	
				H-1→L	14	
	S <sub>4</sub>	4.5353 (273)	-872.717695	H-2→L	25	0.071
				H→L+1	19	

\*Energien für S<sub>0</sub> Zustände und absolute Energien ( $E_{\text{abs.}}$ ) in Hartree, für S<sub>1</sub>-S<sub>4</sub> Zustände relative Energien in eV und nm (in Klammern). \*\*Index <sup>2</sup> entspricht einer Doppelanregung.

**DFT/B3LYP-optimierte Geometrie**

Tabelle A 2-4: Berechnete absolute CASSCF und SS/MS-CASPT2 Energien in [Hartree] so wie zugeordnete Zustände für FP-, E\_D- und MP-Modelle der DFT/B3LYP-optimierten Geometrie in der GLH-162-Struktur.

Modell	Zust.	$E_{\text{CASSCF}}$	Zust.	$E_{\text{SS-CASPT2}}$	Zust.	$E_{\text{MS-CASPT2}}$
<b>FP</b>	S <sub>0</sub>	-868.22649	S <sub>0</sub>	-870.985594	S <sub>0</sub>	-870.995667
	S <sub>1</sub>	-868.108947	S <sub>2</sub>	-870.888618	S <sub>1</sub>	-870.902061
	S <sub>2</sub>	-868.091156	S <sub>1</sub>	-870.900957	S <sub>2</sub>	-870.877798
	S <sub>3</sub>	-868.06827	S <sub>3</sub>	-870.848312	S <sub>3</sub>	-870.848218
	S <sub>4</sub>	-868.03185	S <sub>4</sub>	-870.813245	S <sub>4</sub>	-870.812982
<b>E_D</b>	S <sub>0</sub>	-868.229324	S <sub>0</sub>	-870.987615	S <sub>0</sub>	-870.997823
	S <sub>1</sub>	-868.111157	S <sub>2</sub>	-870.890218	S <sub>1</sub>	-870.904049
	S <sub>2</sub>	-868.093058	S <sub>1</sub>	-870.902584	S <sub>2</sub>	-870.878951
	S <sub>3</sub>	-868.070489	S <sub>3</sub>	-870.849685	S <sub>3</sub>	-870.849581
	S <sub>4</sub>	-868.034395	S <sub>4</sub>	-870.814934	S <sub>4</sub>	-870.814633
<b>MP</b>	S <sub>0</sub>	-868.233584	S <sub>0</sub>	-870.990703	S <sub>0</sub>	-871.000473
	S <sub>1</sub>	-868.113692	S <sub>2</sub>	-870.891923	S <sub>1</sub>	-870.906197
	S <sub>2</sub>	-868.092755	S <sub>1</sub>	-870.903567	S <sub>2</sub>	-870.879961
	S <sub>3</sub>	-868.073342	S <sub>3</sub>	-870.851518	S <sub>3</sub>	-870.851424
	S <sub>4</sub>	-868.03747	S <sub>4</sub>	-870.81698	S <sub>4</sub>	-870.816635

## Anhang

**Tabelle A 2-5: Berechnete MS-CASPT2 Energien\*, Oszillatorenstärken, entsprechende Konfigurationen\*\* mit dazugehörigen Gewichten für FP-,E\_D- und MP-Modelle der DFT/B3LYP-optimierten Geometrie in der GLH162-Protonierung.**

Modell	Zust.	E <sub>MS-CASPT2</sub>	<i>f</i>	Konfiguration	Gewicht [%]
<b>FP</b>	S <sub>0</sub>	-870.995667	-	222222000000	75
	S <sub>1</sub>	2.5472 (487)	1.63	22222ud00000	39
				22222u0d0000	14
	S <sub>2</sub>	3.2074 (387)	0.61	222220200000	21
				22222ud00000	20
				2222u2d00000	14
				222u22d00000	21
	S <sub>3</sub>	4.0123 (309)	0.60×10 <sup>-2</sup>	2222ud200000	16
				222220ud0000	11
				22222u00d000	10
S <sub>4</sub>	4.9711 (249)	0.41×10 <sup>-2</sup>	22u222d00000	24	
			222u2d200000	11	
<b>E_D</b>	S <sub>0</sub>	-870.997823	-	222222000000	75
	S <sub>1</sub>	2.5517 (486)	1.65	22222ud00000	39
				22222u0d0000	14
	S <sub>2</sub>	3.2347 (383)	0.62	222220200000	21
				22222ud00000	21
				2222u2d00000	14
				222u22d00000	21
	S <sub>3</sub>	4.0339 (307)	0.65×10 <sup>-2</sup>	2222ud200000	16
				222220ud0000	11
				22222u00d000	10
S <sub>4</sub>	4.9848 (249)	0.44×10 <sup>-2</sup>	22u222d00000	24	
			222u2d200000	11	
<b>MP</b>	S <sub>0</sub>	-871.000473	-	222222000000	75
	S <sub>1</sub>	2.5654 (483)	1.59	22222ud00000	53
				22222u0d0000	11
	S <sub>2</sub>	3.2793 (378)	0.64	222220200000	28
				2222u2d00000	16
	S <sub>3</sub>	4.0558 (306)	0.71×10 <sup>-2</sup>	222u22d00000	21
				2222ud200000	16
				222220ud0000	11
22222u00d000				10	
S <sub>4</sub>	5.0025 (248)	0.44×10 <sup>-2</sup>	22u222d00000	24	
			222u2d200000	11	

\*Für S<sub>0</sub> Zustände Energien in Hartree, für S<sub>1</sub>-S<sub>4</sub> Zustände relative Energien in eV und nm in Klammern. \*\*Zahl 2 entspricht einem doppelbesetzten Orbital. u und d bezeichnen eine Einfachbesetzung mit jeweils *spin up* bzw. *spin down*.

## Anhang

**Tabelle A 2-6: Berechnete DFT/MRCI Energien\*, zugeordnete Zustände, entsprechende Konfigurationen\*\* mit den dazugehörigen Wichtungen und Oszillatorenstärken für FP-, E\_D- und MP-Modelle der DFT/B3LYP-optimierten Geometrie in der GLH162-Protonierung**

Modell	Zustand	E	E <sub>abs.</sub>	Konfiguration	Gewicht [%]	f
<b>FP</b>	S <sub>0</sub>	-872.878300	-872.878300	GZ	91	-
	S <sub>1</sub>	2.2112 (560)	-872.797040	H→L	81	1.96
	S <sub>2</sub>	2.6733 (464)	-872.780059	H-1→L	27	0.33
				H <sup>2</sup> →L <sup>2</sup>	24	
				H→L+1	11	
	S <sub>3</sub>	3.5229 (352)	-872.748835	H-2→L	27	0.0042
				H-1,H→L <sup>2</sup>	17	
S <sub>4</sub>	3.9079 (317)	-872.734686	H-1→L	39	0.075	
			H→L+1	18		
<b>E_D</b>	S <sub>0</sub>	-872.880190	-872.880190	GZ	91	-
	S <sub>1</sub>	2.2105 (561)	-872.798957	H→L	82	1.95
	S <sub>2</sub>	2.6893 (461)	-872.781362	H-1→L	27	0.33
				H <sup>2</sup> →L <sup>2</sup>	24	
				H→L+1	11	
	S <sub>3</sub>	3.5372 (351)	-872.750202	H-2→L	27	0.0035
				H-1,H→L <sup>2</sup>	17	
S <sub>4</sub>	3.9227 (316)	-872.736034	H-1→L	39	0.078	
			H→L+1	18		
<b>MP</b>	S <sub>0</sub>	-872.883096	-872.883030	GZ	91	-
	S <sub>1</sub>	2.2417(553)	-872.800647	H→L	81	1.89
	S <sub>2</sub>	2.7408(452)	-872.782306	H-1→L	27	0.37
				H <sup>2</sup> →L <sup>2</sup>	23	
				H→L+1	11	
	S <sub>3</sub>	3.5682 (348)	-872.751900	H-2→L	27	0.0057
				H-1,H→L <sup>2</sup>	16	
S <sub>4</sub>	3,9751 (312)	-872.736946	H-1→L	38	0.084	
			H→L+1	19		

\*Energien für S<sub>0</sub> Zustände und absolute Energien (E<sub>abs.</sub>) in Hartree, für S<sub>1</sub>-S<sub>4</sub> Zustände relative Energien in eV und nm (in Klammern). \*\*Index <sup>2</sup> entspricht einer Doppelanregung.

**CASSCF-optimierte Geometrie**

Tabelle A 2-7: Berechnete absolute CASSCF und SS/MS-CASPT2 Energien in [Hartree] so wie zugeordnete Zustände für FP-, E\_D- und MP-Modelle der CASSCF-optimierten Geometrie in der GLH162-Struktur.

Modell	Zust.	$E_{\text{CASSCF}}$	Zust.	$E_{\text{SS-CASPT2}}$	Zust.	$E_{\text{MS-CASPT2}}$
<b>FP</b>	S <sub>0</sub>	-868.252696	S <sub>0</sub>	-870.986947	S <sub>0</sub>	-870.996248
	S <sub>1</sub>	-868.105913	S <sub>1</sub>	-870.882188	S <sub>1</sub>	-870.907712
	S <sub>2</sub>	-868.083634	S <sub>2</sub>	-870.874522	S <sub>2</sub>	-870.847038
	S <sub>3</sub>	-868.064638	S <sub>3</sub>	-870.832501	S <sub>3</sub>	-870.825347
	S <sub>4</sub>	-868.035986	S <sub>4</sub>	-870.801139	S <sub>4</sub>	-870.800952
<b>E_D</b>	S <sub>0</sub>	-868.254151	S <sub>0</sub>	-870.988303	S <sub>0</sub>	-870.997655
	S <sub>1</sub>	-868.107572	S <sub>1</sub>	-870.883672	S <sub>1</sub>	-870.908734
	S <sub>2</sub>	-868.085075	S <sub>2</sub>	-870.875768	S <sub>2</sub>	-870.848087
	S <sub>3</sub>	-868.066526	S <sub>3</sub>	-870.833806	S <sub>3</sub>	-870.827186
	S <sub>4</sub>	-868.037752	S <sub>4</sub>	-870.802389	S <sub>4</sub>	-870.802277
<b>MP</b>	S <sub>0</sub>	-868.252395	S <sub>0</sub>	-870.986624	S <sub>0</sub>	-870.996007
	S <sub>1</sub>	-868.10585	S <sub>1</sub>	-870.882016	S <sub>1</sub>	-870.90729
	S <sub>2</sub>	-868.083634	S <sub>2</sub>	-870.874413	S <sub>2</sub>	-870.84677
	S <sub>3</sub>	-868.064919	S <sub>3</sub>	-870.832441	S <sub>3</sub>	-870.82555
	S <sub>4</sub>	-868.036347	S <sub>4</sub>	-870.801081	S <sub>4</sub>	-870.800958

## Anhang

**Tabelle A 2-8: Berechnete MS-CASPT2 Energien\*, Oszillatorenstärken, entsprechende Konfigurationen\*\* mit dazugehörigen Gewichten für FP-, E\_D- und MP-Modelle der CASSCF-optimierten Geometrie in der GLH162-Protonierung.**

Modell	Zust.	$E_{MS-CASPT2}$	$f$	Konfiguration	Gewicht [%]
FP	S <sub>0</sub>	-870.996248	-	222222000000	75
	S <sub>1</sub>	2.4092 (515)	1.54	22222ud00000	53
				22222u0d0000	12
	S <sub>2</sub>	4.0602 (305)	0.22	222220200000	28
				2222u2d00000	16
	S <sub>3</sub>	4.6504 (267)	$0.17 \times 10^{-2}$	222u22d00000	18
				2222ud200000	14
				222220ud0000	11
	S <sub>4</sub>	5.3143 (233)	$0.2 \times 10^{-2}$	22222u00d000	10
				22u222d00000	21
E_D	S <sub>0</sub>	-870.997655	-	222222000000	75
	S <sub>1</sub>	2.4197 (512)	1.54	22222ud00000	53
				22222u0d0000	11
	S <sub>2</sub>	4.0700 (305)	0.22	222220200000	28
				2222u2d00000	16
	S <sub>3</sub>	4.6387 (267)	$0.17 \times 10^{-2}$	222u22d00000	18
				2222ud200000	14
				222220ud0000	11
	S <sub>4</sub>	5.3165 (233)	$0.2 \times 10^{-2}$	22222u00d000	10
				22u222d00000	22
MP	S <sub>0</sub>	-870.996007	-	222222000000	75
	S <sub>1</sub>	2.4141 (514)	1.54	22222ud00000	53
				22222u0d0000	11
	S <sub>2</sub>	4.0609 (305)	0.21	222220200000	28
				2222u2d00000	16
	S <sub>3</sub>	4.6384 (267)	$0.16 \times 10^{-2}$	222u22d00000	18
				2222ud200000	14
222220ud0000				11	
S <sub>4</sub>	5.3075 (234)	$0.21 \times 10^{-2}$	22222u00d000	10	
			22u222d00000	21	

Für S<sub>0</sub> Zustände Energien in Hartree, für S<sub>1</sub>-S<sub>4</sub> Zustände relative Energien in eV und nm in Klammern.  
 \*\*Zahl 2 entspricht einem doppelbesetzten Orbital. u und d bezeichnen eine Einfachbesetzung mit jeweils *spin up* bzw. *spin down*.

## Anhang

**Tabelle A 2-9: Berechnete DFT/MRCI Energien\*, zugeordnete Zustände, entsprechende Konfigurationen mit den dazugehörigen Wichtungen und Oszillatorenstärken für FP-, E\_D- und MP-Modelle der CASSCF-optimierten Geometrie in der GLH162-Protonierung.**

Modell	Zustand	$E_{\text{DFTCI}}$	$E_{\text{abs.}}$	Konfiguration	Gewicht [%]	$f$
<b>FP</b>	S <sub>0</sub>	-872.875652	-872.875652	GZ	94	-
	S <sub>1</sub>	2.3697 (523)	-872.788566	H→L	84	1.53
	S <sub>2</sub>	3.3892 (365)	-872.751101	H-1→L	52	0.45
	S <sub>3</sub>	3.9804 (311)	-872.729376	H→L+1	34	0.28
				H-1→L	14	
				H-2→L	11	
	S <sub>4</sub>	4.3782 (283)	-872.714757	H-2→L	27	0.050
		H→L+1	10			
<b>E_D</b>	S <sub>0</sub>	-872.877217	-872.877217	GZ	94	-
	S <sub>1</sub>	2.3668 (524)	-872.790240	H→L	84	1.54
	S <sub>2</sub>	3.3872 (366)	-872.752741	H-1→L	52	0.46
	S <sub>3</sub>	3.9782 (311)	-872.731022	H→L+1	31	0.25
				H-1→L	14	
				H-2→L	13	
	S <sub>4</sub>	4.3835 (283)	-872.716125	H-2→L	25	0.055
		H→L+1	11			
<b>MP</b>	S <sub>0</sub>	-872.875350	-872.875350	GZ	94	-
	S <sub>1</sub>	2.3636 (525)	-872.788491	H→L	84	1.54
	S <sub>2</sub>	3.3790 (367)	-872.751175	H-1→L	52	0.45
	S <sub>3</sub>	3.9725 (312)	-872.729364	H→L+1	31	0.26
				H-1→L	14	
				H-2→L	13	
	S <sub>4</sub>	4.3763 (283)	-872.714525	H-2→L	25	0.051
		H→L+1	11			

\*Energien für S<sub>0</sub> Zustände und absolute Energien ( $E_{\text{abs.}}$ ) in Hartree, für S<sub>1</sub>-S<sub>4</sub> Zustände relative Energien in eV und nm (in Klammern).

### A 3 Das 13-*cis*-Modell

Tabelle A 3-1: Berechnete MS-CASPT2 Energien\*, Oszillatorenstärken, entsprechende Konfigurationen\*\* mit dazugehörigen Gewichten des 13-*cis*-Modells.

Zust.	$E_{\text{MS-CASPT2}}$	$f$	Konfiguration	Gewicht [%]
S <sub>0</sub>	-871.037	-	222222000000	74
S <sub>1</sub>	2.7833 (445)	1.29	22222ud00000	53
S <sub>2</sub>	3.8675 (321)	0.11	222220200000	24
			2222u2d00000	16
S <sub>3</sub>	4.8563 (255)	0.17	222u22d00000	18
			2222ud200000	17
S <sub>4</sub>	5.3819 (230)	$0.10 \times 10^{-3}$	2u2222d00000	20

\*Für S<sub>0</sub> Zustände Energien in Hartree, für S<sub>1</sub>-S<sub>4</sub> Zustände relative Energien in eV und nm in Klammern. \*\*Zahl 2 entspricht einem doppelbesetzten Orbital. u und d bezeichnen eine Einfachbesetzung mit jeweils *spin up* bzw. *spin down*.