

ULTRAGYORS OPTIKAI KAPCSOLÁS MEGVALÓSÍTÁSA FÉNYÉRZÉKENY

FEHÉRJÉKKEL

Magyar Állami Eötvös Ösztöndíj munkabeszámoló – Krekic Szilvia

Áttekintés

Korunk egyre növekvő igényei a gyorsabb információtovábbítás és jelfeldolgozás terén komoly kihívásokat jelent a jelenleg alkalmazott integrált elektronikai rendszereknek. A felmerülő problémák megoldására (mint a termális és kvantum hatások) egy alternatív megoldást jelenthet az integrált optika (IO), amely alapja, hogy az alkalmazott rendszerekben az információ továbbítása és feldolgozása teljesen optikai úton működik. A Magyar Állami Eötvös Ösztöndíj keretén belül 2021. szeptemberétől 4 hónapot tölthettem el Dr. Heiner Zsuzsanna laboratóriumában a berlini Humboldt Egyetemen, ahol különböző fényérzékeny fehérjékből készült vékonyrétegeket vizsgáltam IO felhasználhatóság szempontjából. Kutatómunkám három munkafázisra osztható fel:

1. *Vékonyrétegek előállítása fehérjékből*: bakteriorodopszinből (BR), fotoaktív sárga fehérjéből (PYP) és fikobiliproteinekből (PBP) különböző adalékanyagok hozzáadásával vékonyrétegek készítése, amelyek integrált optikai kapcsolás megvalósításához megfelelő tulajdonságokkal rendelkeznek.

2. *Mérőelrendezés felépítése*: „Homodyne transient grating” vagy homodin tranzien্স rácsos mérőelrendezés felépítése BOXCARS geometriát alkalmazva, különböző hullámhosszú femtoszekundumos pumpa és próba nyalábok esetére.

3. *Optikai kapcsolás megvalósítása*: A mérőberendezés segítségével protein-alapú ultragyors optikai kapcsolás megvalósítása.

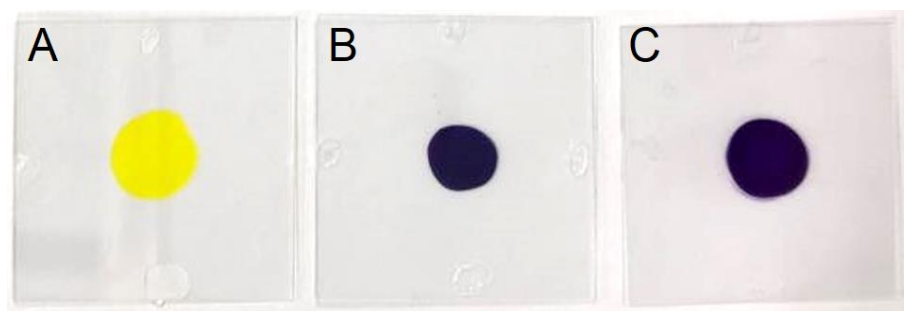
A pályázat menete

1. *Feladat: Mintakészítés*

IO felhasználás szempontjából elengedhetetlen homogén, jó minőségű minták készítése, amelyek megfelelő mechanikai stabilitással, újragenerálhatósággal, valamint fény hatására elegendően nagy nemlineáris optikai változással rendelkeznek. A pályázat egyik kitűzött feladata volt BR, valamint PYP fehérjékkel történő vékonyrétegek készítése, amelyek felhasználhatóak gyors optikai kapcsolásra. Munkám során több mintakészítési módszer is kipróbálásra került. Elsődlegesen BR és PYP törzsoldatokat kombináltam 2-10% térfogatszázalékban glicerinnel, amelyek üveglemezekkel lettek fixálva. A hozzáadott

glicerinnel megakadályozza a fehérje kiszáradását, ezzel megelőzve a minták felületének repedezését, továbbá biztosítja a fehérjék fotociklusának lejátszódásához szükséges magas páratartalmat abban az esetben is, ha a környezet relatív páratartalma alacsonyabb 50%-nál [1]. A minták elkészítéséhez 200 μm vastagságú távtartót alkalmaztam, hogy a rétegvastagság minden esetben ugyanaz legyen.

A pályázat munkatervében betervezett BR-en és PYP-en kívül egy fikobiliproteinekből (PBP) összeállított fehérjekeveréket is megvizsgáltam, mivel előkísérleteink során a keverék gyors kinetikai tulajdonságokat mutatott. A PBP filmet hasonlóan készítettem és fixáltam, mint a korábbi fehérjemintákat. A mintavastagság szintén 200 μm volt.



1. ábra- 200 μm vastagságú (a) PYP, (b) PBP és (c) BR filmek

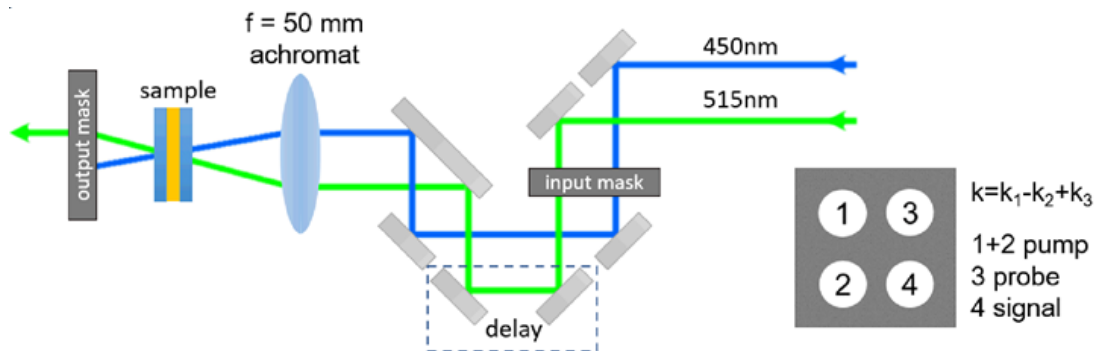
A glicerinnel hozzáadásával készült PYP vékonyfilmek lassabb fotociklussal rendelkeznek, mint az oldatban vagy kristályrácsba rendeződött fehérjék [1]. Hogy elejét vegyem az esetlegesen túl lassú fotociklus problémájának, akrilamiddal is készítettem vékonyfilmeket. A BR akrilamid géllal történő fixálása ismert módszer [2,3], amelyből kiindulva alkalmaztam most PYP-en is. A mintavastagság ebben az esetben 800 μm volt.

A PYP-pel további mintákat készítettem a layer-by-layer (LbL) módszerrel, ahol polielektrolitokkal (negatív töltésű poli-L-glutaminsavval (PGA) és pozitív töltésű polyethylenimine (PEI) és poli-L-lizinnel (PLL)) kezelt felületekre vittem fel az oldatban levő PYP-et. A rétegekészítés során hat réteg PGA-PLL páros építettem üveglemezre. A legfelső réteg a PYP oldat volt, amelyet 5 percig hagytam a pozitívan, illetve negatívan töltött felületen adszorbeálni, majd a felesleget desztillált vízzel lemostam.

2. Feladat: Mérőelrendezés felépítése

A kapcsolás megvalósításához alkalmazott módszer alapja a fehérjerétegekben fény-interferenciával keltett rács [4], illetve az ezen történő fényelhajlás. Dr. Heiner Zsuzsanna laboratóriumában található femtoszekundumos lézerrendszer több hullámhosszon és ismétlési frekvencián működik, így lehetővé tette a kísérletek megismétlését több különböző feltétel mellett.

A mérőelrendezés forrása egy Yb:KGW lézerrendszer, amelynek központi hullámhossza 1028 nm és maximális ismétlési frekvenciája 100 kHz. A rendelkezésre álló 6 W átlagteljesítmény egy nyalábosztó segítségével két részre lett osztva. Az egyik nyaláb kicsiny részéből (néhány μJ) 514 nm-es másodharmonikus impulzusok lettek keltve egy nemlineáris optikai kristályban, míg a nyaláb másik feléből egy optikai parametrikus erősítő (Orpheus, Light Conversion) lett pumpálva, amellyel a mérésekhez alkalmazott különböző hullámhosszúságú lézernyalábok lettek előállítva.



2. ábra – A felépített mérési elrendezés sematikus ábrája (publikálva a 2022-es CLEO konferenciára beadott absztraktban)

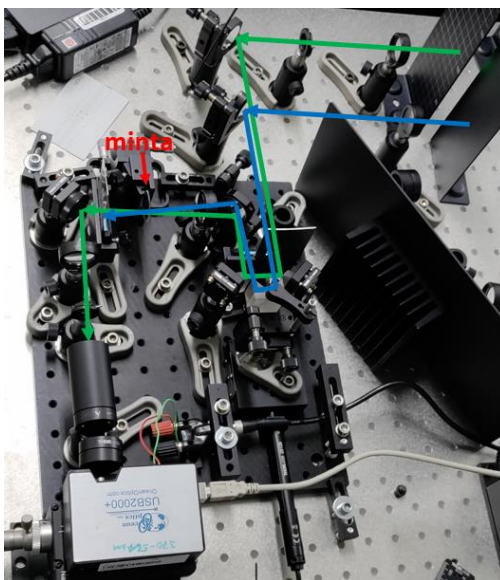
A mérésekhez 180 fs alatti lézerimpulzusok voltak alkalmazva, különböző központi hullámhosszal. A próba és pumpa hullámhosszak (ld. 2. ábra) a fehérjék abszorpciós maximumának és a fotociklusának egyes intermedierinek megfelelően lettek kiválasztva. Ennek megfelelően BR-nél az alkalmazott próba központi hullámhosszak 450, 530, 550 nm hullámhosszúságúak voltak, míg a pumpa központi hullámhossza 514 nm volt. A PYP-nél a próba 514 nm volt, míg a pumpa nyaláb 450 nm vagy 480 nm. A PBP-nél a próba nyaláb 450 nm vagy 550 nm volt, míg a pumpa 514 nm. Az alkalmazott lézer hullámhosszak az 1. táblázatban vannak összefoglalva.

Fehérje	Pumpa központi hullámhossz (nm)	Próba központi hullámhossz (nm)	Folytonos gerjesztés (nm)
BR	514	450, 530, 550	532
PYP	450, 480	514	405
PBP	514	530, 550	532

1. táblázat – Az alkalmazott pumpa és próba központi hullámhosszak

Az általam felépített mérési berendezés sematikus rajza a 2. ábrán található. A mérések során használt pumpa és próba nyalábok 1-10 μm impulzus energiával rendelkeztek, az alkalmazott ismétlési frekvencia 1-100 Hz volt. Nyalábtágítást és térszűrést követően a nyalábok egy maszkon (ld. 2. ábra, „input mask”) haladtak át, létrehozva a méréshez szükséges kettő gerjesztő nyalábot (amely optikai rácst kelt a mintában) és egy próba nyalábot. Az alkalmazott

maszk biztosítja a nyalábok átmerőjének megfelelő nagyságát is, amely a mérésnél meghatározza a mintában gerjesztett rács periódus sűrűségét. A mérésnél alkalmazott mindhárom impulzus (1,2: pumpa, 3: próba, 2. ábra) BOXCARS geometriát követve egy akromát lencsével lett fókuszálva a mintára. A kettő gerjesztő nyaláb (k_1 és k_2 hullámszámvektorral jelölve) időben és térben átfedett a mintában, míg a harmadik nyaláb (k_3 , próba) időben késleltetve lett a próba nyalábokhoz képest egy automatizált mozgatható asztallal, amelynek lépésközét a mérések során 20 fs-nak választottam. Az elrendezésben alkalmazott maszk olyan módon lett kialakítva, hogy eleget tegyen a $k_1 - k_2 + k_3$ fázisillesztési feltételnek. Ezzel a maszk-módszerrel a mintán elhajló, ún. diffraktált nyaláb térben könnyen elkülöníthető a mintára érkező egyéb nyaláboktól, lehetővé téve a diffraktált nyaláb egyszerű detektálását egy spektrométerrel (Ocean Optics, USB2000+). A méréseket 1 Hz, 10 Hz és 100 Hz ismétlési frekvenciákon végeztem. A felépített mérőelrendezés a 3. ábrán látható.



3. ábra – A felépített mérési elrendezés

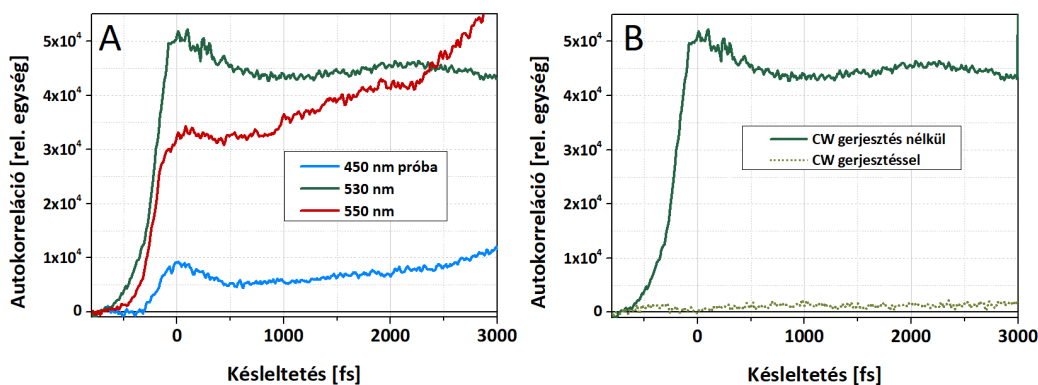
Az eredmények ellenőrzését újabb kísérlettel valósítottam meg, ahol a korábbi elrendezésbe egy folytonos lézer nyalábot is betereltem. Ennek célja az volt, hogy a fehérjét a folytonos lézernyalábbal a fotociklus (az optikai rácskeltesnél alkalmazott kiindulási alapállapothoz képest) más állapotába gerjesszem, így megakadályozva, illetve megváltoztatva az optikai rács keltését. A BR és a PBP esetén a folytonos gerjesztés 532 nm, míg a PYP-nél 405 nm hullámhosszúságú volt.

3. Optikai kapcsolás megvalósítása

3.1. BR vékonyrétegek

A BR-alapú mintákon több különböző próba hullámhosszal történtek mérések. Minden hullámhossz a fehérje fotociklusának figyelembevételével lett kiválasztva, ezzel fókuszálva az olyan gyors átmeneti állapotokra, mint az I vagy a J állapot. Az I intermedier a fotociklus elején található leggyorsabb átmeneti állapot <100 fs-os kialakulási és 500 fs bomlási idővel [5]. Ezen intermedier abszorpciós maximuma 460 nm, ennek megfelelően az egyik általam választott próba hullámhossz 450 nm volt, ezzel minimalizálva a BR alapállapotának a detektált jelhez való hozzájárulását. Ezzel ellentétben, 530 nm és 550 nm-en az alapállapot kontribúcióját kívántam vizsgálni. Korábban már történtek adalékanyag nélkül készült, szárított bR rétegeken kapcsolós kísérletek [6–8]. Mivel a bR fotociklusa, különösen ennek az ultragyors skálán (<10 ps) megjelenő intermedierei jobban ismertek, mint a többi protein esetében, így először a glicerinnel készült bR mintákat tanulmányoztam. Ez a PYP-nél és a PBP fontos feltétel volt, mivel ezeknél a fehérjéknél még nem végeztek méréseket a fotociklus korai szakaszáról megfelelő femtoszekundumos (10^{-15} sec) időbeli felbontással.

A mérésekből azt láttam, hogy 450 nm-es próba impulzusnál detektált jel kisebb intenzitású, mint a 530 vagy 550 nm-en detektált jel, míg 530 nm-en mértük a legnagyobb intenzitást. Az elsődleges 500 fs-os lecsengés után, amely az I állapotnak felelhet meg, további intermedierek kialakulását és lecsengését láthatjuk 3 ps időskálán (4. ábra, A rész). Minden mérés 1 Hz-es ismétlési frekvenciával lett mérve.



4. ábra – Detektált jelek 514 nm pumpa mellett, különböző próba nyaláboknál (A). További 532 nm-es folytonos (CW) gerjesztés hatására történő kifakítás 530 nm-es próbánál (B)

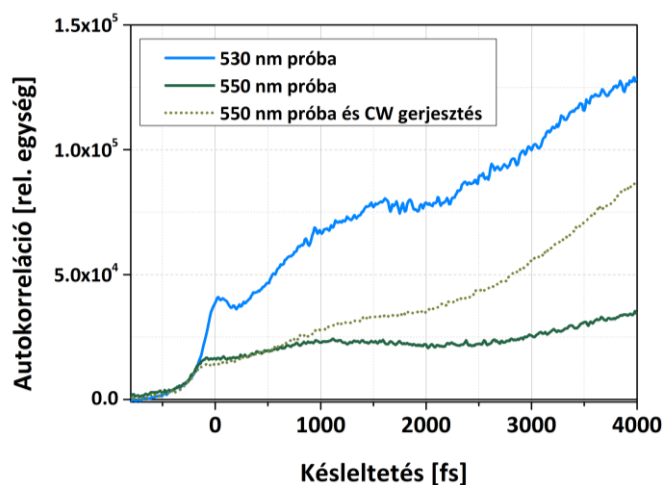
Ha a mintát a mérést megelőzően 532 nm-es folytonos lézertfényel (CW) gerjesztettem 5 mW átlagteljesítményt alkalmazva, a mért intenzitás nulla közeli értékekre csökken, amely a fehérje „kifakítását” jelenti (4. ábra, B rész). Tehát az alkalmazott folytonos gerjesztés hatására a fehérje egy másik intermedier állapotba kerül, amelynek nincs abszorpciója 514 nm-en, így

optikai rácsa ebben az esetben nem hozható létre a mintában. Ebből adódóan nincs difraktált jel, azaz nem detektáltam jelet. A CW gerjesztés megszűnésével a minta visszatért eredeti állapotába minden próba hullámhossznál, vagyis a minta reverzibilisen fakítható, amely a gyors kinetikával kombinálva a BR-t IO kapcsolásra alkalmazhatóvá teszi.

A pályázatom munkatervében említett módosított retinált tartalmazó BR-t több próbálkozás után sem tudtam előállítani, ezért kollaborációs partner bevonására lesz szükség, amely túlmutat a jelen pályázat időkeretén. Ehelyett PBP-n végeztem méréseket.

3.2. PBP vékonyrétegek

A kísérleteket 1 Hz-es ismétlési frekvencián végeztem. Méréseim során azt tapasztaltam, hogy mindkét próba hullámhossznál 4 ps-os időskálán a mért jel intenzitása időben növekszik, amely intermedierek felhalmozódását jelenti ezeken a hullámhosszokon. Habár 530 nm-en a mért jel intenzitása nagyobb mint 550 nm-en, időben ugyanazokat az intermedierek figyelhetők meg mindkét próba hullámhosszon. 532 nm-es CW gerjesztés hatására ez az intenzitás tovább növekszik. A méréseimhez megértéséhez megfelelő kinetikai modellt fogok kidolgozni a későbbiekben témavezetőimmal, amely segítséget nyújt a mérési adatok megértésében.



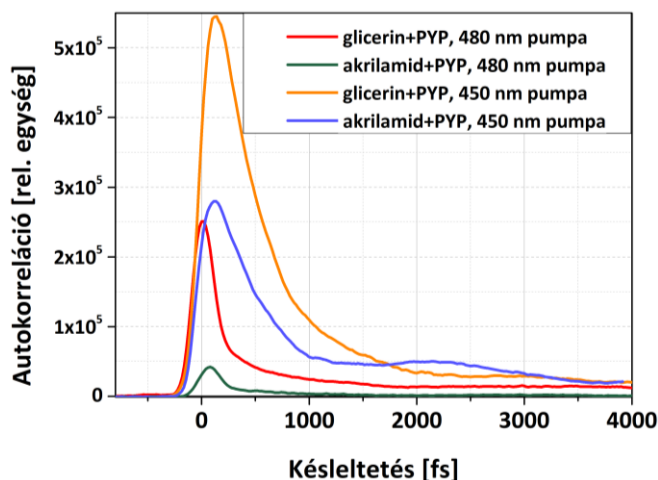
5. ábra – PBP-en mért adatok különböző próba hullámhosszokon és CW gerjesztéssel, illetve anélkül.

3.3. PYP vékonyrétegek

PYP-pel három módszerrel készültek vékonyrétegek: glicerin vagy akrilamid hozzáadásával, és LbL módszerrel. Az első két módszerrel készült vékonyrétegeken sikeresen demonstráltam optikai kapcsolást. A mintákat két pumpa hullámhosszal vizsgáltam meg, mivel a PYP-nél bizonyított, hogy a gerjesztési fény hullámhossza nagyban befolyásolja a fotociklus lejátszódásának módját és kinetikáját [9]. A két alkalmazott hullámhossz 450 és 480 nm volt, hogy a PYP alapállapotának abszorpciós maximumának mindkét oldalán történjen gerjesztés

és mindkét kinetikát megmérjem. A méréseket 10 ps-os időskálán végeztem, 1 Hz, 10 Hz, 100 Hz ismétlési frekvenciákon.

A mért jelek intenzitása nagyban eltér egymástól 1 Hz ismétlési frekvencián, viszont méréseim alapján megállapítható, hogy 480 nm-es gerjesztési hullámhossz esetében a fotociklus elején bekövetkező gyors változás gyorsabban megy végbe, mint 450 nm-es gerjesztési hullámhosszat alkalmazva (6. ábra). A pontos időállandó meghatározásához a mért adatokra a fotociklus elméleti modellje alapján illeszteni kell. Az illesztés a legegyszerűbb esetben exponenciálisok összegével közelíthető [10]. A 450 nm gerjesztési hullámhosszon mért glicerines minta fotociklusának elején bekövetkező gyors átalakulás időállandója illesztés során 455 fs-nak adódott, amely gyorsabb a jelenleg irodalomban publikált adatnál [11]. Ennek magyarázata az lehet, hogy a méréseket sokkal jobb időbeli felbontással tudtam elvégezni, mint az irodalomban közölt esetekben. Következő lépésem az összes adatra történő illesztés lesz (jelenleg folyamatban van), amellyel pontos információt nyerhetünk a kinetika változásáról különböző feltételek mellett.



6. ábra – Glicerinnel és akrilamiddal készített minták gyors kinetikája 1 Hz-es ismétlési frekvencián, különböző pumpa hullámhossz mellett

További észrevétel, hogy habár glicerinen nagyobb intenzitású jelet tudtam detektálni, akrilamidban gyorsabb a kinetika, illetve 10 ps-os időskálán kevesebb intermediert átalakuláshoz köthető ingadozást detektáltam. A PYP-en további CW gerjesztéses kísérleteket végeztem 5-30 mW-es intenzitással, amellyel azt láttam, hogy habár a BR-rel ellentétben a minta nem teljesen fakult ki. Továbbá, a fotociklus kinetikája függ a CW gerjesztés intenzitásától, miszerint kicsi CW intenzitásoknál a kinetika gyorsabb lesz, majd az intenzitás növekedésével visszatér az eredeti gerjesztés nélküli állapotba. A pontos kinetikai adatokat a mért adatokra történő exponenciális illesztés után tudom megmondani. Méréseimből adódóan elmondható, hogy a PYP alkalmas 1 Hz-es ismétlési frekvencián történő ultragyors kapcsolásra,

illetve a fotociklus elején bekövetkező femtoszekundumos változás lehetőséget nyújt gyors THz-es kapcsolásra is. A méréseket megismételtem 10 Hz-es és 100 Hz-es ismétlési frekvencián is. A gyors kinetika a fotociklus elején hasonlóságot mutatott az 1 Hz-es mérésekkel, de 1 ps-nál hosszabb időskálán ingadozásokat tapasztaltam a mintákban, amelyek a fotociklus intermediereinek dinamikus egymásba alakulásának köszönhető. A jelenség pontos megértéséhez további kísérletekre van szükség, amely a jelen pályázat keretein belül nem tudott megvalósulni.

Az LbL módszerrel készült mintákon nem tudtam reprodukálható méréseket végezni, a mintákészítésen további módosításokat szükséges elvégezni.

Eredmények összefoglalása

Vékonyrétegeket készítettem BR-ből, PBP-ből és PYP-ből különböző adalékanyagok hozzáadásával, amelyeken diffrakciós kísérleteket végeztem egy általam felépített homodin tranziens rácsos mérőelrendezéssel. A méréseket különböző hullámhosszakon és ismétlési frekvenciákon végeztem, amellyel a protein alapú tisztán optikai elven működő kapcsolás megvalósításához szükséges első lépést demonstráltam. A méréseket megismételtem folytonos előgerjesztést alkalmazva is, amellyel bizonyítottam, hogy a kapcsolási feltételek változnak PYP-nél és PBP-nél; a BR pedig maga kapcsolható folytonos gerjesztésű fényvel a fehérje kifakítása által. PYP-ben megmértem a leggyorsabb fotociklus intermedier sebességi állandóját különböző feltételek mellett, amely gyorsabbnak adódott, mint a jelenleg tudományban ismeretes sebességi állandó. PYP-ben továbbá különböző gerjesztési hullámhosszaknál jelentős különbségeket tapasztaltam az első átmeneti állapot lecsengésének időállandójában, amely tovább módosítható folytonos fénygerjesztés alkalmazásával. PBP-en elsőként végeztem ultragyors méréseket.

Eredményeimet elsőként a CLEO –Conference on Lasers and Electro-Optics 2022 konferencián kívánjuk bemutatni előadás formájában, amely 2022. május 15-20. között lesz megrendezve San Jose-ban (California, USA), az előadás 2-oldalas kivonata egy konferencia proceedingben lesz publikálva várhatóan 2022 nyarán. Továbbá, eredményeimből a következő néhány hónapban legalább egy referált cikket írok témavezetőim segítségével, amelyet Q1 rangú nemzetközi tudományos folyóiratban tervezünk publikálni.

A témában történt szakmai aktivitás

Nemzetközi konferencián bemutatott előadás:

1. *Ultrafast all-optical switching demonstrated on bacteriorhodopsin and photoactive yellow protein films*, S. Krekic, M. Mero, A. Dér és Z. Heiner. CLEO: Conference on Lasers and Electro-Optics, hibrid konferencia: virtuálisan és San Jose-ban (California, USA), 2022. május 15-20.

Felhasznált irodalom

1. S. Krekic, T. Zakar, Z. Gombos, S. Valkai, M. Mero, L. Zimányi, Z. Heiner, and A. Dér, *Front. Plant Sci.* **11**, 1567 (2020).
2. D. Rao, F. J. Aranda, D. N. Rao, Z. Chen, J. A. Akkara, D. L. Kaplan, and M. Nakashima, *Opt. Commun.* **127**, 193 (1996).
3. Z. Chen, D. Govender, R. Gross, and R. Birge, *Biosystems* **35**, 145 (1995).
4. A. Gelzinis, R. Augulis, V. Butkus, B. Robert, and L. Valkunas, *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Bioenergetics* **1860**, 271 (2019).
5. A. C. Terentis, L. Ujj, H. Abramczyk, and G. H. Atkinson, *Chem. Phys.* **313**, 51 (2005).
6. L. Fábrián, Z. Heiner, M. Mero, M. Kiss, E. K. Wolff, P. Ormos, K. Osvay, and A. Dér, *Opt. Express* **19**, 18861 (2011).
7. L. Fábrián, E. K. Wolff, L. Oroszi, P. Ormos, and A. Dér, *Appl. Phys. Lett.* **97**, 142 (2010).
8. A. Dér, S. Valkai, L. Fábrián, P. Ormos, J. J. Ramsden, and E. K. Wolff, *Photochem. Photobiol.* **83**, 393 (2007).
9. L. T. Mix, E. C. Carroll, D. Morozov, J. Pan, W. R. Gordon, A. Philip, J. Fuzell, M. Kumauchi, I. Van Stokkum, and G. Groenhof, *Biochemistry* **57**, 1733 (2018).
10. M. Schmitt, B. Dietzek, G. Hermann, and J. Popp, *Laser Photon. Rev.* **1**, 57 (2007).
11. P. E. Konold, E. Arik, J. Weißborn, J. C. Arents, K. J. Hellingwerf, I. H. M. van Stokkum, J. T. M. Kennis, and M. L. Groot, *Nat. Commun.* **11**, 4248 (2020).