BAKTERIORODOPSZIN ÉS KOENZIMEK FEMTOSZEKUNDUMOS IDŐFELBONTÁSÚ SPEKTROSZKÓPIAI VIZSGÁLATA

Ph.D. értekezés

HEINER ZSUZSANNA

TÉMAVEZETŐK:

Dr. Osvay Károly

Egyetemi docens

Szegedi Tudományegyetem, Optikai és Kvantumelektronikai Tanszék

Dr. Groma Géza

Tudományos főmunkatárs

MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biofizikai Intézet

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Fizika Doktori Iskola

Szeged, 2013

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS.....	4
2. TUDOMÁNYOS ELŐZMÉNYEK.....	7
2.1. A VIZSGÁLT BIOLÓGIAI ANYAGOK.....	7
2.1.1. <i>A BAKTERIORODOPSZIN ÉS ALKALMAZÁSAI</i>	7
2.1.2. <i>KOENZIMEK</i>	11
2.1.2.1. <i>A FLAVIN ADENIN DINUKLEOTID</i>	13
2.1.2.2. <i>A REDUKÁLT NIKOTINAMID ADENIN DINUKLEOTID</i>	14
2.1.2.3. <i>AZ AUTOFLUORESZCENCIA VIZSGÁLATÁNAK JELENTŐSÉGE</i>	16
2.2. A MÉRÉSI MÓDSZEREK ELMÉLETI ALAPJAI.....	18
2.2.1. <i>A TÖRÉSMUTATÓ LEÍRÁSA, ÉRTELMEZÉSE</i>	18
2.2.1.1. <i>A TÖRÉSMUTATÓ</i>	18
2.2.1.2. <i>A LORENTZ-FÉLE MODELL, ABSZORPCIÓ ÉS DISZPERZIÓ</i>	19
2.2.2. <i>IMPULZUSTERJEDÉS DISZPERZÍV KÖZEGBEN</i>	21
2.2.3. <i>INTEGRÁLT OPTIKAI SENZOROK</i>	23
2.2.4. <i>AZ IDŐBONTOTT SPEKTROSKÓPIA ALAPJAI</i>	25
2.2.4.1. <i>FLUORESZCENCIA SPEKTROSKÓPIAI ALAPOK</i>	27
2.2.4.2. <i>IDŐBONTOTT FLUORESZCENCIA SPEKTROSKÓPIA MÉRÉSI MÓDSZEREI</i>	28
2.2.4.3. <i>ABSZORPCIÓS SPEKTROSKÓPIA ALAPOK</i>	35
2.2.4.4. <i>AZ ULTRAGYORS TRANZIENS ABSZORPCIÓ MÉRÉSE</i>	36
3. CÉLKITŰZÉSEK.....	39
4. KÍSÉRLETI ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	41
4.1. TÖRÉSMUTATÓ MEGHATÁROZÁSA FOLYADÉKOKBAN.....	41
4.1.1. <i>KÉTKOMPONENSŰ FOLYADÉKOK TÖRÉSMUTATÓJA</i>	41
4.1.2. <i>A bR MINTA ELŐKÉSZÍTÉSE</i>	42
4.1.3. <i>A bR TÖRÉSMUTATÓ-MÉRÉSÉNEK KÍSÉRLETI MÓDSZERE</i>	42
4.2. ULTRAGYORS OPTIKAI KAPCSOLÁS BAKTERIORODOPSZINNAL.....	44
4.2.1. <i>A PUMPA ÉS A PRÓBA IMPULZUSOK ELŐÁLLÍTÁSA</i>	44
4.2.2. <i>A KAPCSOLÁS MEGVALÓSÍTÁSÁNAK KÍSÉRLETI ELRENDEZÉSE</i>	45
4.3. IDŐBONTOTT FLUORESZCENCIA SPEKTROSKÓPIAI MÉRŐRENDSZER.....	46
4.3.1. <i>A MINTÁK ELŐKÉSZÍTÉSE</i>	46
4.3.2. <i>A FREKVENCIA KONVERZIÓ ÉS TCSPC TECHNIKÁN ALAPULÓ MÉRÉSEK TERVEZÉSE, KÍSÉRLETI ÖSSZEÁLLÍTÁSA</i>	46
4.3.3. <i>AZ ADATOK KIÉRTÉKELÉSE</i>	53
4.3.3.1. <i>AZ IDŐFELBONTÁS, ÁTVITELI FÜGGVÉNY</i>	53
4.3.3.2. <i>ZAJSZÜRÉS AZ SVD MÓDSZERREL</i>	55
4.3.3.3. <i>A MÉRŐRENDSZER OPTIMALIZÁLÁSA ÉS KALIBRÁCIÓJA LÉZERFESTÉKEKKEL</i>	55
4.3.3.3. <i>A BPDN ANALÍZIS (KIÉRTÉKELÉSI ALGORITMUS)</i>	58
4.4. <i>AZ ABSZORPCIÓKINETIKA MÉRÉSHEZ ALKALMAZOTT PUMPA-PRÓBA RENDSZER</i>	61
4.4.1. <i>A MINTA ELŐKÉSZÍTÉSE ÉS TULAJDONSÁGAI</i>	61
4.4.2. <i>A KÍSÉRLETI ELRENDEZÉS</i>	61
4.4.3. <i>ADATKIÉRTÉKELÉS A TRANZIENS ABSZORPCIÓS SPEKTROSKÓPIÁBAN</i>	63

5. TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	67
5.1. A bR SZUSZPENZIÓ TÖRÉSMUTATÓJÁNAK MÉRÉSE.....	67
5.1.1. A TRIS PUFFER TÖRÉSMUTATÓJA	67
5.1.2. A bR SZUSZPENZIÓ KONCENTRÁCIÓFÜGGŐ TÖRÉSMUTATÓJA.....	69
5.1.3. AZ IZOLÁLT BÍBOR MEMBRÁNOK TÖRÉSMUTATÓJA	71
5.1.4. ÖSSZEFOGLALÁS.....	72
5.2. ULTRAGYORS OPTIKAI KAPCSOLÁS BAKTERIORODOPSZINNAL	73
5.2.1. MÉRÉSI EREDMÉNYEK.....	73
5.2.2. ELMÉLETI MEGGONDOLÁSOK	75
5.2.3. ÖSSZEFOGLALÁS.....	78
5.3. A FAD FLUORESZCENCIA KINETIKÁJÁNAK VIZSGÁLATA KÜLÖNBÖZŐ MIKROKÖRNYEZETEK BEN	80
5.3.1. A FAD FLUORESZCENCIAJÁNAK MÉRÉSE KÜLÖNBÖZŐ MIKROKÖRNYEZETEK BEN.....	80
5.3.2. ANALÍZIS ÉS EREDMÉNYEK.....	85
5.3.3. ÖSSZEFOGLALÁS.....	90
5.4. A NADH ABSZORPCIÓ KINETIKÁJÁNAK MÉRÉSE NYITOTT ÉS ZÁRT KONFORMÁCIÓBAN.....	92
5.4.1. STATIKUS ABSZORPCIÓ ÉS FLUORESZCENCIA MÉRÉSEK	92
5.4.2. TRANZIENS ABSZORPCIÓS MÉRÉSEK	94
5.4.3. A KINETIKÁK ILLESZTÉSE ÉS ÉRTELMEZÉSE.....	99
5.4.4. ÖSSZEFOGLALÁS.....	101
6. ÖSSZEFOGLALÁS	103
6.1. MAGYAR NYELVŰ TÉZISSZERŰ ÖSSZEFOGLALÓ	103
6.2. ANGOL NYELVŰ ÖSSZEFOGLALÓ	105
6.3. A TÉZISEK ALAPJÁT KÉPEZŐ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	112
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	114
Köszönetnyilvánítás	116
Irodalomjegyzék.....	118

1. BEVEZETÉS

Az első lézer megépítésekor, 1960-ban új korszak kezdődött az optikában. A lézerek ezt követő rohamos fejlődése sok más területen is új tudományos eredményeket hozott, rendkívül sok alkalmazást tett lehetővé. Az alapkutatásokban azóta szinte napról-napra újabb eredményeket érnek el ezen eszközökkel, mint például az attoszekundumos impulzusok, lézeres gyorsítás, Bose-Einstein-kondenzáció terén. A mindennapi életben a lézerlemezjátszóktól a száloptikán alapuló fénytávközlésig, a traffipaxoktól a hologramokig, az orvosok munkaeszközein át gyakorta találkozhatunk a technika ezen vívmányaival.

Már az első lézerek megjelenésétől kezdve a kutatók érdeklődésének homlokterébe került a különböző módszerekkel előállított rövid lézerimpulzusok időtartamának csökkentése. Érthető ez a törekvés, hiszen a lézerek segítségével olyan időben, térben és spektrálisan egyaránt jelentős és szabályozható energia-kondenzációt sikerült elérni, amely addig mind az optikai, mind pedig a spektroszkópai gyakorlatban ismeretlen volt.

Az ultrarövid impulzusok előállítása 1964-ben, a módusszinkronizálás felfedezésével kezdődött [1]. Húsz évvel később, 1984-ben felismerték, hogy a lézerrezonátoron belül elhelyezett prizmás kompresszor alkalmazásával a csoportsebesség-diszperzió csökkenthető [2-4], így az impulzushossz akár 27 fs-ra rövidíthető [5]. Manapság a rezonátorban ún. fázismodulált tükröket [6-8] és/vagy telítődő abszorbert használva [9] 3–4 fs impulzushossz is elérhető [10, 11]. Sok alkalmazási terület azonban az oszcillátorokból nyerhetőnél lényegesen nagyobb energiákat igényel [12], ami az erősített ultrarövid impulzusok előállításának kutatását vonta maga után már a '70-es évek végétől kezdődően egészen napjainkig [13].

A legjelentősebb előrelépés ezen a területen a fázismodulált impulzuserősítés (chirped pulse amplification, CPA) felfedezése volt [14-16]. Ennek lényege, hogy az erősítendő impulzusok időbeli hosszát előbb megnyújtják, majd erősítés után összenyomják. Minderre azért van szükség, mert nyújtás nélkül az impulzusok intenzitása az erősítőben annyira megnőne, hogy roncsolná magát az erősítő kristályt, illetve maga az impulzus térben és időben nemkívánatos torzulásokat szenvedne – többek között az önfókuszálás, önfázismoduláció és következményei miatt. Megnyújtott időtartama, azaz lecsökkentett intenzitása miatt az így kapott fázismodulált impulzus már felerősíthető az optikai elemek roncsolásának veszélye nélkül. Ez történik meg a második lépésben. A már megerősített, de még nyújtott impulzust egy megfelelő kompresszorral össze kell nyomni közel az eredeti hosszára.

Az ultrarövid impulzusok megjelenése és alkalmazása hozzájárult ahhoz, hogy a gyors folyamatok kutatásában az elektronikus eszközök feloldóképességének elvi határát (néhány pikoszekundum) sikerüljön áttörni. Ezen impulzusok $\geq 10^{10}$ W/cm² nagyságrendű intenzitása a fény–anyag kölcsönhatás kutatása terén már tanulmányozhatóvá tette a korábban megjósolt nemlineáris effektusokat. Ezzel új tudományterületek és spektroszkópai alkalmazások egész sora jött létre. Az elmúlt 15–20 évben nagyon aktív és eredményes kutatások zajlottak a femtobiológia és femtokémia témakörben, melynek köszönhetően az ezen új diszciplínák létrejöttében közreműködő interdiszciplináris közösség egyik jeles vezetőjét, Ahmed H. Zewailt 1999-ben kémiai Nobel-díjjal tüntették ki [17-19]. Ő olyan, ún. *pumpa-próba* mérési eljárást fejlesztett ki, amellyel femtoszekundumos időskálán követhető a kémiai–biológiai reakciók lefolyása, vagyis az atomok molekulán belüli mozgása, miközben azok a reagáló molekulákban átrendeződnek. Útnak indítva mindezzel a femtoszekundumos spektroszkópia irányvonalát.

Munkám során ultrarövid lézerimpulzusok spektroszkópai alkalmazásával foglalkozom. Részből femtoszekundumos oszcillátorok nJ energiájú impulzusait használtam, részben pedig mJ energiára erősített impulzusokat, ahogy az aktuális *pumpa-próba* kísérlet megkövetelte. Értekezésem két fő alkalmazási területre osztható. Az egyik a *bakteriorodopszin* membránfehérje vizsgálata és lehetséges alkalmazása az optikai távközlésben, a másik pedig a *flavin adenin dinukleotid* és a redukált *nikotinamid adenin dinukleotid* koenzimek ultragyors időbontott spektroszkópai vizsgálata. Mivel e koenzimek a sejtek energiatermelő folyamataiban (energiatranszport láncban) vesznek részt, vizsgálatukon keresztül többek között a sejtek metabolikus állapota is tanulmányozható.

Dolgozatomban először röviden áttekintem a tudományos előzményeket. Bemutatom a kísérleteim során használt biológiai anyagokat – a *bakteriorodopszin*, a *flavin adenin dinucleotid* és a redukált *nicotinamid adenin dinucleotid* –, kitérve a technikai alkalmazási lehetőségekre, illetve kutatásuk jelentőségére. Ezután összefoglalom az ultrarövid impulzusok terjedését, a hullámvezetők működését, az abszorpciós és fluoreszcencia spektroszkópai módszerek alapjait, illetve az ehhez szorosan kapcsolódó definíciókat, az elektrodinamikai és nemlineáris optikai vonatkozásokat. A következő fejezetben a tudományos előzmények ismeretében megfogalmazom célkitűzéseim. A negyedik fejezetben ismertetem az alkalmazott kísérleti eszközöket valamint mérési módszereimet. Bemutatom az általam használt lézerek,

lézerrendszerek főbb paramétereit, kitérek a konkrét kísérleti elrendezésekre, a kísérletek során használt biológiai anyagok előkészítésére, a mérési adatok kiértékelésére. Az ötödik fejezetben részletesen ismertetem új tudományos eredményeim. Végezetül pedig magyar majd angol nyelven tézisszerű összefoglalást adok eredményeimről.

Méréseimet a *Szegedi Tudományegyetem Optikai és Kvantumelektronikai Tanszékén* (TeWaTi Kutatócsoport), a *Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biofizikai Intézetében* (Femtobiológiai laboratórium), valamint a strasbourgi *CNRS IPCMS, Département d'Optique ultrarapide et de Nanophotonique* (BIODYN Kutatócsoport) lézerlaboratóriumaiban végeztem el.

2. TUDOMÁNYOS ELŐZMÉNYEK

2.1. A VIZSGÁLT BIOLÓGIAI ANYAGOK

E fejezetben összefoglalom az általam vizsgált biológiai anyagok főbb tulajdonságait, fizikai paramétereit, bemutatom mind a bakteriorodopszint, mind pedig a koenzimeket részletesen. Külön kiemelem, miért fontos e biológiai anyagok kutatása, működésük illetve szerepük tanulmányozása.

2.1.1. A BAKTERIORODOPSZIN ÉS ALKALMAZÁSAI

Az *archeák* doménjébe tartozó halobaktériumok, így a *Halobacterium salinarum* is a magas sótartalmú, napfényben gazdag vizek lakói, nagy mennyiségben találhatóak meg például tengermelléki sólepárló medencékben [20]. A nagyjából 0.5 μm átmérőjű és 4–10 μm hosszúságú, pálcika alakú sejt helyváltoztatásához csillókat használ. Sejtfalát szabályos, hexagonális rácsba rendeződött 200 kDa molekulasúlyú glikoprotein és kevés szénhidrát alkotja. Ez a fal veszi körül a lipidekből felépülő, pigmentált sejtmembránt.

Kiderült, hogy a baktérium sejtmembránjában a szemben található rodopszin nevű molekulához nagyon hasonló fehérje található (1. ábra), melyet **bakteriorodopszinnak** (bR) nevezték el [21]. Szerepe – a fotoszintéziséhez hasonlóan – a napfény energiájának átalakítása biokémiai energiaformává [22]. Az utóbbi évek genetikai vizsgálatai alapján kiderült, hogy egy igen közönséges baktérium (SAR 86) is tartalmaz egyfajta rodopszint. A részletesebb vizsgálat megállapította, hogy ennek szerepe szintén a napfény energiájának hasznosítása [23]. E baktérium igen nagy mennyiségben van jelen valamennyi tengerben, óceánban, ami azt jelenti, hogy a földi napfényenergia hasznosításában sokkal nagyobb a rodopszinok szerepe, mint azt korábban gondoltuk.

Egyszerű kezelhetősége miatt a *Halobacterium salinarum*nak – illetve ezen belül is elsősorban membránfehérjéjének, a bakteriorodopszinnak – a kutatásával nagyszámú biológus illetve biofizikus foglalkozik. Mivel a kísérletek során a molekula számos gyakorlati alkalmazhatóságára is fény derült, manapság a bR a biotechnológiában ill. biofotonikában is népszerű molekulává vált.

A bR-re először biológiai alapkutatások során figyeltek fel. Ez a rendszer sokkal egyszerűbb, mint akár a kloroplasztisz, akár bármely más ismert biológiai energiaátalakító rendszer, így sokkal könnyebben tanulmányozható [22]. Az ehhez hasonló egyszerű

rendszerek megismerése a biológiában számtalanszor jelenti az első lépést a komplexebb rendszerek feltérképezésében.

A bR fehérjemolekula hét alfa-hélixből (*1.a* ábra, *A, B, ...G* betűkkel jelölve) és körülbelül 250 aminosavból áll [24]. A fehérjék a sejt felületén szabályos hexagonális kristályszerkezetet alkotnak [25], ezek az úgynevezett bíbormembrán foltok, amelyek akár a sejt teljes felületének 50%-át is elfoglalhatják. A fehérje bíbor színét egy hozzá kapcsolódó kromofór, a retinál adja. (A retinál közös festékanyag, tulajdonképpen az A-vitamin egyik alapja). A fehérjeműködés során fény hatására proton pumpálódik a sejt belsejéből az extracelluláris térbe, az így létrejött elektrokémiai gradiens később a sejt számára az élethez szükséges energiává alakul [21, 26].

A fehérje belsejében egy retinál molekula található, amely a 216-os számú lizin oldallánchoz kapcsolódik protonált Schiff-bázison keresztül (*1.a* ábra). A retinál egy foton elnyelése hatására izomerizálódik, a Schiff-bázis protonja különböző, funkcionális szempontból aktív csoportokon keresztül a sejten kívüli térbe jut, majd a retinál a membrán belseje felől reprotonálódik és a fehérje újra alapállapotba kerül, készen egy újabb ciklusra. A proton transzlokációja során a fehérje különböző konformációs állapotokon megy keresztül, amelyek spektroszkópiailag jól elkülöníthetők egymástól, amint ezt az *1.b* ábra mutatja.

1. ábra – A bR szerkezete (a), valamint fotociklusa (b) [27]

Ezen állapotok sorozatát hívjuk *fotociklusnak* (*1.b* és *2. ábra*):

A betűk az alap és a köztes állapotokat jelölik, az indexek pedig az abszorpciós maximumok hullámhosszát nm-ben. Minden köztes állapot is fényérzékeny [28, 29], azaz megfelelő hullámhosszú fénnel történő második gerjesztés után a molekula rövid időn belül visszatér az alapállapotba (BR₅₇₀).

A fentiek miatt a bR-t gyakran nevezik „optikailag programozható” anyagnak [27]. Optikai minőségű vékonyrétegeket is gyakran készítenek belőle, amit a bioelektronikai ill. fotonikai alkalmazásokban használnak. Ezekben a szárított bR mintákban például a fotociklus M utáni állapotokat nem tartalmaz, így közvetlenül M-ből cseng le a BR₅₇₀ alapállapotba. Az egyes állapotok élettartama (2. ábra) néhány száz fs-tól (BR → I → J) több száz ms-ig tart (M → BR) [30, 31].

2. ábra – A bR fotociklusa az átmeneti időállandókkal [32]

A fotokémiai reakciókkal együtt jár az abszorpció változása, így a törésmutató is megváltozik a Kramers–Kronig-relációnak (ld. 2.2.1.2 fejezet) megfelelően [33, 34], melyeket a 3.a és b ábrákon mutatok be.

3. ábra – A bR abszorpciós spektrumai (a) és törésmutatójának változása (b) a különböző konformációs állapotokban [35]

A bioelektronikában rögtön felismerték ezen optikai tulajdonságok perspektíváját. Napjaink kommunikációs hálózatainak adatforgalma és sebessége folyamatosan növekszik, jelenleg az 1 Tbit/s-os hálózat képviseli az elvárt sebességet és adatátviteli kapacitást. Általános vélemény, hogy a teljesen optikai adatátvitel az egyik legígéretesebb irány e cél eléréséhez. Az integrált optikai fejlesztések egyik kulcskérdése egy olyan, megfelelő nemlineáris optikai (NLO) tulajdonságokkal rendelkező anyag megtalálása, ami aktív szerepet tölthet be az integrált optikai áramkörökben. Erre a célra mindezidáig folyadékkristályokat, illetve félvezető anyagokat használtak, melyek azonban nem váltak be maradéktalanul. A legfrissebb kutatások szerint sokoldalú és költséghatékony megoldást jelenthetnek erre a célra a szerves, π -konjugált anyagok a jelenleg alkalmazott szervetlen, félvezető anyagok helyett [36-38]. A szerves anyagok ugyanis magas (harmadrendű) polarizálhatósággal rendelkeznek, ráadásul kétfoton-abszorpciós veszteségek nélkül. Ezekkel azonban problémák adódtak, mivel a folyadékkristályok nem rendelkeznek elegendően nagy fényindukált törésmutató-változással, a szerves kémiai úton előállítható π -konjugált anyagok fejlesztése és az optikai felhasználás szempontjából történő optimalizálása pedig még hosszabb időt vesz igénybe¹. A természet által készen „kínált” π -konjugált anyagnak, a bakteriorodopsinnak viszont amellet, hogy más optikai anyaggal összemérhető az indukált törésmutató-változása, a stabilitása is megfelelő, sőt szárított réteg formájában akár évtizedekig megőrzi funkcionalitását. Emellet gyakorlatilag tetszőlegesen sokszor újragenereszthető, genetikai módosításokkal különböző tulajdonságai – például az egyes állapotok lecsengési ideje – széles határok között változtathatóak, így kinetikailag is igen jól tervezhető [39].

Mindezek miatt a bR-t az integrált optikában, de számos más helyen is igen változatos módon alkalmazzák. A bR segítségével például optikai kapcsoló építhető [40], ami a bR fényindukált törésmutató-változását használja ki. A publikációk egy része a fehérje fotoelektromos tulajdonságainak felhasználását tárgyalja [41], illetve számos szabadalom alapul azon, hogy a bR polarizációs hologramok rögzítésére képes, ezáltal dinamikus, optikai adattároló eszközök alapját képezheti a jövőben [42, 43]. A fentiekén kívül számos publikáció jelent meg a bR egyéb felhasználási lehetőségeiről: UV szűrőként, optikai teljesítmény-határolóként is alkalmazható [44], valamint nemlineáris optikai tulajdonságainak felhasználása révén másodharmonikus keltésére is alkalmas lehet [45-48].

Az elektronikában ismert kapcsolók pontosan úgy befolyásolják az elektromos jeleket, mint az előző bekezdésben megismert szerkezet a fényjeleket. Ezzel a módszerrel a bR-nek

¹ Jóllehet ez az élettartam néhányszorosára növelhető alacsony hőmérséklet, illetve extrém alacsony páratartalom mellett, de ezeket a körülményeket a gyakorlati alkalmazás során nehéz létrehozni.

akár teljesen optikai úton működő chippek létrehozásában is kulcsszerepe lehet. Sokkal valószínűbb azonban, hogy az optikai számítógépek helyett csak a továbbra is elektromos úton működő chippek közötti kommunikációban fogják felváltani a fényjelek az elektromos jeleket. Ennek elsődleges oka, hogy a számítógépekben ma az adatfeldolgozás szűk keresztmetszetét nem a mikroprocesszor, hanem az adatbuszok jelentik, így ezek gyorsítása segítheti a teljesítmény további növelését. Mivel az elektromos jeltovábbítás sebessége és a távolsága a tudományos–technikai határ közelében van, az egyik megoldást a tisztán optikai jeltovábbítás jelentheti [49]. A nagysebességű internet kapcsolatokhoz már manapság is fényjeleket használnak, melyek optikai szálakban haladnak. Komoly kutatások folynak – többek között az Intel-nél is – olyan módszerek kidolgozására, amellyel az optikai jelátvitelt a számítógép chipjeinek, memóriájának és háttértárjainak kommunikációja során is alkalmazzák [50].

2.1.2. KOENZIMEK

Nagyon sok enzim összetett fehérje, így működésükhöz egy nem fehérje természetű molekula szükséges, amit **koenzimnek** nevezünk. A koenzimek kis molekulatömegű, eltérő kémiai karakterű szerves vegyületek, amelyek egyes esetekben fémiont is tartalmaznak. Az enzimfehérjéhez kémiai kötésekkel kapcsolódnak. Ezek a kötések nagyon különbözők lehetnek (pl. H-hidak, ionos, kovalens kötések).

Azok a koenzimek, amelyek gyenge kémiai kötésekkel kapcsolódnak az enzimfehérjékhez *disszociál*isak. A reakció végén a koenzim disszociál az enzimről és egy második reakcióban, amelyet egy másik enzimfehérje katalizál alakul vissza a kiindulási formává, vagyis regenerálódik. Ilyen koenzimek például a hidrid anion átvitelben szerepet játszó **nikotinamid adenin dinukleotid** (NAD) vagy az egyszénatomos intermedierek szállításában közreműködő tetrahidrofólsav (FH₄) [51, 52].

Bizonyos koenzimek szorosan kapcsolódnak az enzimfehérjékhez, és a katalitikus ciklust követően nem válnak el az enzimtől. Az enzimfehérjéhez szorosan kapcsolódó koenzimet *prosztetikus csoport*nak nevezzük. Ilyen prosztetikus csoport például az elektrontranszport láncban szerepet játszó **flavin adenin dinukleotid** (FAD) vagy a transzaminálási reakcióban résztvevő piridoxálfoszfát [51, 52].

A legtöbb koenzimet a sejt az intermediér anyagcserében vitaminokból állítja elő. Sok vitaminnak biokatalitikus szerepe van: a vitamin maga a koenzim illetve a koenzim

előnyaga. Vannak olyan vitaminok, amelyek antioxidáns hatásukkal a szervezet redox homeosztázisát befolyásolják, mások viszont hormonszerű hatással rendelkeznek. Megkülönböztetünk vízzoldékony és zsírloldékony vitaminokat. A vízzoldékony vitaminok többnyire koenzimek, a zsírloldékony vitaminok nem koenzimek, hanem más úton befolyásolják az anyagcsere folyamatokat (pl. A-vitamin–rodopszin–retinál kapcsolat) [52].

Munkám során az energiatranszport láncban résztvevő koenzimek, a NAD és a FAD időbontott spektroszkópiai vizsgálatával foglalkoztam. Az általam vizsgált koenzimek főszerepet játszanak a sejtek energiatermelő folyamataiban oly módon, hogy a kémiai energiát hasznos metabolikus energiává alakítják át [51]. A mitokondrium belső membánjában az elektrontranszport (légzési) lánc enzimei végzik az oxidatív foszforilációt (4. ábra). A légzési lánc működése során protonokat pumpál az intermembrán térbe. A p^+ gradienst tovább erősíti, hogy az O_2 redukciója során víz keletkezik, ami további 2 H^+ -nal csökkenti a belső térben a protonkoncentrációt. Az így kialakuló proton gradiens működteti a protontranszporttal kapcsolt ATP szintáz, amely a nagy energiájú foszfát kötéssel rendelkező ATP (*adenozin trifoszfát*) molekulát hozza létre. Ezt az összefüggő hálózatot szokták sejt légzésnek is nevezni, ami olyan ATP termelő folyamat, amiben a végső elektron akceptor valamilyen szervetlen molekula. A légzési lánc nagyon hatékony: minden pár elektron a NADH-ban 2.5 mol ATP szintéziséhez elegendő energiát hordoz, a FADH pedig 1.5 mol ATP-hez elegendőt.

4. ábra – A mitokondrium energiatranszportjának sematikus rajza [53]

2.1.2.1. A FLAVIN ADENIN DINUKLEOTID

A flavin adenin dinukleotid egy redox kofaktor, amely számos fontos reakcióban vesz részt a sejtek metabolizmusában [51, 52]. A FAD két különböző állapotban létezhet, amelyek az elektron(ok) befogadásával (akceptor) vagy átadásával (donor) különböznek egymástól. A molekula riboflavint (B2-vitamin) tartalmaz, amely az ADP (adenozin difoszfát) molekula foszfát csoportjához kapcsolódik. Az izoalloxazin csoport ribitolhoz kötött szén–nitrogén kötéssel (ld. 5. ábra).

A FAD (oxidált vagy kinon forma) 2 elektront és 2 protont megkötve FADH_2 -vé (redukált vagy hidrokinon forma) alakul. E két forma abszorpciós spektrumában is különbözik egymástól.

5. ábra – A FAD molekula kémiai struktúrája [54]

A FAD abszorpciós csúcsa 440 nm körül van, míg fluoreszcencia maximuma 530 nm (6. a ábra). A molekula két aromás gyűrűjéből (5. ábra) az izoalloxazin csoport fluoreszkál, az ADP csoport nem. Az ún. nyitott konformációs állapotban a két csoport távol van egymástól, ilyen esetben a fluoreszcencia élettartama a nanoszekundumos tartományba esik. Ezzel szemben az összehajtott (stacked) konformációban (pl. vízben) az ADP csoport közel kerülve az izoalloxazinhoz kioltja annak fluoreszcenciáját, melynek eredményeképpen az élettartam ps-os értékekre csökken [55, 56]. A zárt formában a rövid lecsengés a gyors intramolekuláris elektron transzferből származik az adenin és a gerjesztett izoalloxazin csoportok között. A két konformációra azonos abszorpciós és fluoreszcencia spektrum jellemző, jelezve, hogy csak a fluoreszcencia élettartama érzékeny az izoalloxazin kromofór körüli környezetre. Az

irodalomban fellelhető fluoreszcencia élettido mérések jellemzője, hogy egy-egy szűk időablakra korlátozódnak és nem vizsgálják a fluoreszcencia teljes (100 fs – 10 ns) időtartományát. A különböző oldószerek, a hőmérséklet, a viszkozitás, pH, stb. erős hatással lehet a FAD konformációs szerkezetére, amelyeket az eddigi tanulmányok során szintén nem vizsgáltak. Az irodalomban található összehasonlító vizsgálatok szerint a szabad FAD-ra 2–3 ns körüli lecsengés jellemző, egyes fehérjékhez kötött formában az élettido 10–100 ps tartományba kerül [57] (6. b ábra).

6. ábra – (a) A FAD és NADH abszorpciós (szaggatott vonal) és fluoreszcencia (folytonos vonal) spektruma [58] (b) a szabad és kötött FAD fluoreszcencia élettideje [57]

2.1.2.2. A REDUKÁLT NIKOTINAMID ADENIN DINUKLEOTID

A nikotinamid adenin dinukleotid (NAD⁺), valamint a foszforilált és redukált formája, a NADP⁺, a NADH és a NADPH, szintén központi szerepet játszik a sejtek anyagcseréjében és energiatermelésében, úgymint a hidrid-akceptor és donor-hidrid koenzimek [51, 52]. Az intracelluláris NADH két formában létezik, az egyik a szabad, a másik a különböző fehérjékhez kötött NADH.

A NADH két kromofórt tartalmaz (7. ábra), az egyik az adenin, a másik pedig a dihidronikotinamid, melyek abszorpciós maximumai 260 illetve 340 nm (6. a ábra, kék, szaggatott vonal) [59]. A különböző oldószerek, a hőmérséklet, a viszkozitás, stb. erős hatással lehet a NADH konformációs szerkezetére [60, 61]. A fluoreszkáló csoport a dihidronikotinamid (emissziós maximum 460 nm), amely vagy direkt módon, vagy az adenin csoport abszorpcióját követő hatékony fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET)

útján gerjeszhető. Utóbbi feltétele, hogy a molekula zárt konformációs állapotban legyen [59]. A metanol (MeOH) jelenléte a nyitott konformációs állapotnak kedvez, így csökkenti a FRET lehetőséget a két kromofór között. A NADH oxidált formája (NAD^+) nem-fluoreszcens.

7. ábra – A NADH zárt és nyitott konformációban [59]

A szabad NAD(P)H gerjesztett állapotának élettideje 0.4 ns, azonban fehérjéhez kötött formában az élettide egy nagyságrenddel nagyobb, 1–3 ns körüli (8. ábra) [62]. A két forma aránya erősen függ a mikrokörnyezettől, így – mint azt a következő fejezetben részletesen bemutatom – a fluoreszcencia élettide mérésével jól jellemezhető a sejt anyagcseréjének állapota. Ugyanakkor abszorpció kinetikai méréseket a molekula konformációjának változására vonatkozóan eddig még nem közöltek az irodalomban.

8. ábra – A szabad és kötött NADH fluoreszcencia kinetikája. A folytonos fekete vonal a rendszer átviteli függvénye, a belső ábra pedig a három exponensből álló illesztés amplitúdó spektruma [62].

2.1.2.3. AZ AUTOFLUORESZCENCIA VIZSGÁLATÁNAK JELENTŐSÉGE

A rugalmas szórás, a fluoreszcencia, a foszforeszcencia és a Raman spektroszkópia bőven tartalmaznak a szövetek biokémiai és morfológiai összetételét illetően olyan információkat, amelyek tükrözik a betegségek jelenlétét és stádiumát a szövetekben [63, 64]. Az idő- és hullámhosszbontott fluoreszcencia spektroszkópiát a 2000-es évektől kezdve gyakran kombinálják képalkotó eljárásokkal (pl. fluorescence lifetime imaging - FLIM, Förster resonant energy transfer - FRET), hogy képalkotással egybekötve mérjék a fluoreszcencia jeleket szabad és kötött koenzimek (NADH és FAD), valamint például melanin, kollagén, elasztin, porfirin esetében, amelyek erős ún. **autofluoreszcenciát** (biológiai struktúrák természetes fényemissziója, *natural fluorescence*) mutatnak.

A spektrálisan bontott fluoreszcencia életidő diagnosztika új lehetőséget teremtett, hogy megkülönböztethessük a sejttípusokat a bennük felhalmozódott kromofórok alapján. Ily módon lehetőség van „*in vivo*” feltárni fluoreszkáló aminosav oldalláncok (tirozin, triptofán, fenilalanin), a szerkezeti fehérjéknek (elasztin, kollagén) vagy akár néhány koenzim jelenlétét. A NADH erősen fluoreszkál, azonban elveszti e képességét az oxidációja során. A FAD esetében ez épp fordítva történik, az oxidált formájában képes fluoreszkálni [55, 65]. Számos kutató kimutatta, hogy amikor a közeli UV tartományban gerjesztjük a szöveteket, tumorszövetben az endogén fluoreszcencia 500 nm körül lecsökken a normális környező szövetekhez viszonyítva [66]. Az eltérések az oxidált állapotú flavinok és a redukált NADH relatív mennyiségének csökkenéséből eredhetnek rosszindulatú szövetekben, Ennek kvitatív jellemzésére korábban az úgynevezett redox arányt (a FAD és NADH fluoreszcencia intenzitás aránya) használták. Mint a 9. ábrán látható, a FLIM képek bővebb információt nyújtanak a sejtek metabolikus állapotáról [63, 66]. Hasonló diagnosztikai eljárást alkalmaznak a szemészetben is, ahol szintén a két kofaktor redox aránya utalhat a cukorbetegségre már korai stádiumban is [67, 68].

9. ábra – „*In vivo*” 3 dimenziós többfotonos FLIM felvételek a szövetek diagnosztizálására: (a-c) redox arány; (d-f) átlagos NADH élettidő; (g-i) átlagos FAD élettidő. Az *a, d, g* oszlopok normál sejtműködést, a *b, e, h* oszlopok rossz sejtműködést, rákos elváltozás korai szakaszát mutatják, amelyet később a *c, f, i* oszlopok jobb felbontása is megerősít [66].

Összefoglalva tehát a NADH és a FAD fluoreszcencia életidejének mérése lehetőséget biztosíthat a rákos sejtek, illetve egyes neurodegeneratív betegségek, cukorbetegség, öregedés, stb. diagnosztizálására [63, 64, 66-70]. Problémát jelenthet azonban, hogy az „*in vivo*” mérések során a túl sok életidő komponens és bonyolultság miatt nehéz egyértelmű korrelációkat találni. Érdemes tehát körbejárni, hogy ezen molekulákon oldat fázisban, az oldószerek polárosságának, H-kötéseinek és pH értékeinek változtatásával milyen fluoreszcencia jellemzők állapíthatók meg.

2.2. A MÉRÉSI MÓDSZEREK ELMÉLETI ALAPJAI

E fejezetben összefoglalom röviden a munkámhoz szorosan kapcsolódó elméleti spektroszkópiai vonatkozásokat. Bemutatom az általam alkalmazott mérési módszerek alapjait, kitérek az egyes definíciókra. Rövid leírást adok a törésmutatóról, valamint ennek kapcsán az abszorpcióról és diszperzióról, illetve a törésmutató különbségen alapuló integrált optikai szenzorok működéséről. Összefoglalom az időbontott spektroszkópia alapjait, kitérve részletesebben az általam alkalmazott mérési módszerekre.

2.2.1. A TÖRÉSMUTATÓ LEÍRÁSA, ÉRTELMEZÉSE

2.2.1.1. A TÖRÉSMUTATÓ

A fény-anyag kölcsönhatás következtében az anyagot gerjesztő $\tilde{E}(t)=E \cdot e^{(-i\omega t)}$ elektromágneses tér hatására az anyagban $\tilde{P}(t)$ polarizáció lép fel. A „hagyományos”, azaz lineáris optikában az indukált polarizáció lineárisan függ az elektromos térerősségtől [71], nagy térerősség esetén azonban gyakran $E(t)$ -szerinti sorfejtéssel közelíthető [72], amely mind a lineáris, mind a nemlineáris függést magába foglalja. Homogén, nem mágneses közeg elektromos térre adott válasza végtelen gyors anyagi válasz esetén a következő alakban írható,

$$\tilde{P}(t) = \epsilon_0 [\chi^{(1)} \tilde{E}(t) + \chi^{(2)} \tilde{E}^2(t) + \chi^{(3)} \tilde{E}^3(t) + \dots] \equiv \tilde{P}^{(1)}(t) + \tilde{P}^{(2)}(t) + \tilde{P}^{(3)}(t) + \dots \quad (2.1)$$

A $P^{(1)}$ a lineáris polarizációt, a $P^{(2)}$, $P^{(3)}$ a másod- és harmadrendű polarizációt jelöli, $\chi^{(1)}$ a lineáris szuszceptibilitás tenzor, az $\epsilon_0 = 8,854 \dots \times 10^{-12} \text{ F/m}$ pedig a vákuum permittivitása. A $\chi^{(2)}$, $\chi^{(3)}$, ... tagok sorban a szuszceptibilitás tenzor magasabb rendjeit jelölik. A Maxwell-egyenletekből levezethető hullámegyenletben a (2.1)-gyel megadott mennyiség szerepel a forrástagban, amely mind a közeg térre kifejtett hatását, mind a közeg válaszát leírja. A lineáris polarizáció a közeg hagyományos optika keretein belüli válaszát írja le, pl. diszperzió, diffrakció, lineáris abszorpció. A magasabb rendű tagok pedig a nemlineáris optikai jelenségeket felelősek, pl. harmonikus keltés, önfókuszálás, többfotonos abszorpció.

A lineáris polarizáció és a fenomenológikus Maxwell-egyenletekben szereplő elektromos eltolódási vektor kapcsán definiálható a dielektromos tenzor,

$$\epsilon = \epsilon_r \epsilon_0 = (1 + \chi) \epsilon_0, \quad (2.2)$$

ahol ε_r az anyag relatív permittivitása [71]. Nem mágneses közegekben a hullámegyenlet megoldásaiban fellépő hullámvektor a $k = n'\omega / c_0$ alakban írható, ha a komplex törésmutatót $n'^2 \equiv \mu_0 \varepsilon c_0^2 = \varepsilon_r$ módon definiáljuk. Az törésmutató valós része a fázissebességgel, a képzetes rész pedig az abszorpcióval kapcsolatos mennyiség. Mivel a fázissebesség anyagi minőségtől függő mennyiség, az anyagokat egyszerűen a törésmutatójukkal (n) szokás jellemezni, ami a vákuumbeli (c_0) és anyagbeli fénysebesség aránya ($n=c_0/c$), másképpen (nem mágneses, átlátszó anyagok esetén):

$$n = \sqrt{\frac{\varepsilon}{\varepsilon_0}} = \sqrt{1 + \chi}, \quad (2.3)$$

tehát az anyagra jellemző első rendű szuszceptibilitás határozza meg. Elektromágneses tér hatására az anyagok elektronszerkezetük (adott χ) miatt nem csak bizonyos frekvenciájú fotonokat abszorbeálnak, hanem megváltoztatják a fény terjedési sebességét is, ráadásul a különböző hullámhosszakra nézve különböző mértékben, vagyis diszperziót okoznak. Ezeken túlmenően az anyagi jellemzők határozzák meg a kettőtörés jelenségét is (amelyre a nemlineáris optikai bevezetőben bővebben kitérek). A következőkben nézzük meg kicsit részletesebben az abszorpciót és diszperziót.

2.2.1.2. A LORENTZ-FÉLE MODELL, ABSZORPCIÓ ÉS DISZPERZIÓ

Tekintsünk egy dielektromos közeget, mint rezonáns atomok összességét, amelyben a polarizáció sűrűség $\tilde{P}(t)$ és az elektromos mező $\tilde{E}(t)$ dinamikus viszonya egy lineáris másodrendű közönséges differenciálegyenlettel leírható. A rezgő oszcillátor ω_0 sajátfrekvenciával és σ csillapítási együtthatóval (2.1)-ből:

$$\frac{d^2 \tilde{P}}{dt^2} + \sigma \frac{d\tilde{P}}{dt} + \omega_0^2 \cdot \tilde{P} = \omega_0^2 \varepsilon_0 \chi_0 \tilde{E}, \quad (2.4)$$

ahol

$$\chi_0 = \frac{N \cdot e^2}{\varepsilon_0 m \omega_0^2}. \quad (2.5)$$

Itt N az m tömeggel rendelkező atomok száma egységnyi térfogatban, e pedig az elektron töltése. Ennek a frekvenciafüggő χ -re kiszámolható megoldását az (2.3)-ba behelyettesítve a törésmutató frekvenciafüggése az

$$n'^2(\omega) = 1 + \frac{N \cdot e^2 / \varepsilon_0 m}{\omega_0^2 - \omega^2 + i\sigma\omega} \quad (2.6)$$

alakban írható le. Ez a Lorentz-féle oszcillátor modell [71].

Az így kapott komplex törésmutató valós része a frekvenciafüggő törésmutatót, azaz a diszperziót, képzetes része pedig az abszorpciót írja le. Vagyis a komplex törésmutató egyszerű alakban

$$n' = n + i\kappa, \quad (2.7)$$

ahol n a valós törésmutató, $\kappa(\omega)$ pedig az extinkciós koefficiens, amely az abszorpciós koefficiensből, $\alpha(\omega)$ –ból származtatható:

$$\alpha(\omega) = \frac{4 \cdot \pi}{\lambda} \kappa(\omega). \quad (2.8)$$

E megközelítésnél a Kramers–Kronig-reláció kimondja, hogy az anyag valós törésmutatója kapcsolatban áll az extinkciós koefficienssel minden egyes frekvencián [71, 73, 74]:

$$n(\omega) - 1 = \frac{c}{\pi} P \int_0^{\infty} \frac{\kappa(\omega')}{\omega'^2 - \omega^2} d\omega', \quad (2.9)$$

ahol az integrál előtti P a Cauchy-féle főértéket jelenti.

A diszperzió (azaz a törésmutató hullámhosszfüggése) leírására számos közelítő formula használata terjedt el. Leggyakrabban a Cauchy-, Laurent- és a Sellmeier-típusú formalizmus szerint adják meg egy kérdéses anyag törésmutatóját, persze mindez erősen függ az anyag halmazállapotától és a kérdéses hullámhossztartománytól is (nem részletezve a hőmérséklet, nyomás, stb. hullámhosszfüggését). A Cauchy- és Laurent-formulák a törésmutató-négyzet egyszerű λ^2 szerinti Taylor-sorfejtésén alapulnak [75, 76], hátrányuk viszont, hogy csak szűk hullámhossztartományon adnak pontos értéket. A Sellmeier-típusú diszperziós egyenlet azonban a Lorentz-féle oszcillátor modell alapján, az abszorpciós helyektől távoli megoldásokra támaszkodva,

$$n(\lambda)^2 - 1 = \sum_i \frac{A_i \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - \lambda_i^2} \quad (2.10)$$

alakban adja meg a diszperziót, ahol A_i és λ_i a Sellmeier-együtthatók, a hullámhossz pedig μm -ben van definiálva [77]. E formula már sokkal szélesebb hullámhossztartományra terjed ki, és általánosan alkalmazható például gázokra, folyadékokra, dielektrikumokra, stb.. Munkám során az anyagok törésmutatójának modellezésére a Sellmeier-formulát használtam.

2.2.2. IMPULZUSTERJEDÉS DISZPERZÍV KÖZEGBEN

Méréseimet femtoszekundumos impulzusokkal végeztem. Ebben a fejezetben rövid leírást adok az ultrarövid lézerimpulzusok diszperzív közegben történő terjedéséről, valamint ismertetem a vonatkozó definíciókat.

Az ultrarövid impulzusok közegbeli terjedésének leírását legegyszerűbben a Maxwell-egyenletekből levezethető hullámeqyenlet megoldásaként tárgyalhatjuk, az elektromos térerősség megadásával. A „rövidség” és az ezzel együtt járó nagy sáv szélesség miatt az anyagi diszperzió hatása jelentős, amely az impulzus „szétfolyását” okozza.

Az ultrarövid impulzusok lineáris terjedésének leírásához tekintsünk egy diszperzív közeget, amelyekben a hullámterjedés a frekvenciától függ. Az impulzus terjedését kétféle módon adhatjuk meg: a frekvenciaképben illetve az időképbeli leírással [78]. Az idő- és frekvencia-képbeli leírás között a Fourier-transzformáció teremt kapcsolatot. Mivel méréseimet a frekvenciaképbeli leírás alapján lehet értelmezni, így a következőkben csak erről írok röviden.

A közegbe belépő impulzus időbeli $E_{be}(t)$ térerősségét előállíthatjuk olyan ω frekvenciájú monokromatikus komponensek szuperpozíciójával, amelyek a_{be} amplitudóval és $\phi_{be}(\omega)$ fázissal írhatók le. Az időbeli térerősség így

$$E_{be}(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} a_{be}(\omega) e^{i\phi_{be}(\omega)} e^{i\omega t} d\omega \quad (2.11)$$

alakú. Közegben való terjedés során nemcsak a spektrális komponensek amplitudójának eloszlása változik $A(\omega)$ amplitudó-átvitellel, hanem a fázisuk is eltolódik $\phi(\omega)$ -val. A közeget elhagyó impulzus időbeli alakját a spektrális térerősség Fourier-transzformáltja adja. Az így megváltozott fázisú és amplitudójú monokromatikus komponensek összegzésével megkapjuk a közegből kilépő jel időbeli térerősségét:

$$E_{ki}(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} A(\omega) a_{be}(\omega) e^{i(\phi_{be}(\omega) - \phi(\omega))} e^{i\omega t} d\omega \quad (2.12)$$

Az impulzusterjedés illetve a fény-anyag kölcsönhatás következtében bekövetkező időbeli torzulást a közegnek az impulzus fázisszerkezetére gyakorolt hatása okozza. A $\phi(\omega)$ fázisátvitelt jellemezhetjük oly módon, hogy $\phi(\omega)$ -t Taylor-sorba fejtjük az ω_0 központi frekvencia körül:

$$\phi(\omega) = \phi(\omega_0) + \phi'(\omega_0)\Delta\omega + \frac{1}{2}\phi''(\omega_0)\Delta\omega^2 + \frac{1}{6}\phi'''(\omega_0)\Delta\omega^3 + \dots, \quad (2.13)$$

ahol $\Delta\omega = \omega - \omega_0$ és

$$\phi'(\omega_0) = \left. \frac{d\phi}{d\omega} \right|_{(\omega=\omega_0)} ; \phi''(\omega_0) = \left. \frac{d^2\phi}{d\omega^2} \right|_{(\omega=\omega_0)} \dots \quad (2.14)$$

A fenti tárgyalás alapján az impulzusterjedés leírásához szükségünk van a $\phi(\omega)$ ismeretére, amely tulajdonképpen a diszperzió mértékével és minőségével kapcsolatos.

Mivel a legtöbb esetben a terjedés tényleges geometriai hosszát nem ismerjük, ezért az impulzus terjedésének általánosabb leírásához célszerű közvetlenül a $\phi(\omega)$ fázisfüggvényt, és annak deriváltjait használni. A következőkben vegyük végig, hogy milyen fizikai jelentés tulajdonítható az egyes fázisderiváltaknak (10. ábra). A $\phi(\omega_0)$ állandó fázistolást jelent, az $E(t)$ intenzitásburkolón belüli kezdőfázissal kapcsolatos mennyiség (carrier envelope phase, CEP). Ennek csak néhány optikai ciklusból álló impulzusok esetén van jelentősége [79-81].

A $\phi'(\omega_0)$ idő dimenziójú mennyiség. Azt mondhatjuk, hogy $\phi'(\omega_0)$ az az idő, ami alatt az ω_0 központi frekvenciával jellemezhető impulzus a közegen keresztülhalad. Mindezek alapján *terjedési idő*nek, vagy más néven **csoporkésleltetés**nek (group delay, GD) nevezzük.

A $\phi''(\omega_0)$ a **csoporkésleltetés-diszperzió** (group delay dispersion, GDD), amely az impulzus kiszélesedéséért felelős. A $\phi'''(\omega_0)$ -t pedig **harmadrendű diszperzió**nak (third order dispersion, TOD) nevezzük, mely az időbeli alak megváltozásáért, elő- illetve utóimpulzusok megjelenéséért felelős.

10. ábra – A fázisderiváltak hatásai az impulzusra

A magasabb rendű tagokat pl. fázismodulált impulzuserősítésnél szokták figyelembe venni, azonban a legtöbb esetben elhanyagolható a hatásuk (a páros és páratlan rendek a GDD és TOD-nak megfelelő változásokat okozzák).

A különböző optikai elemek fázistulajdonságainak jellemzésére a $\phi'(\omega=\omega_0)$ és $\phi''(\omega=\omega_0)$ fázisderiváltak értékeit szokás megadni, azonban bizonyos esetekben (pl. dielektrikum tükrök) magát a $\phi'(\omega)$ ill. $\phi''(\omega)$ függvényt használják.

Az időbontott spektroszkópiai alkalmazások során kulcskérdés, hogy a $t=0$ időpontot pontosan meghatározzuk, ami a pumpa és próba impulzusok tökéletes átfedésének időpontját jelenti (ld. 4. fejezetekben részletesen). Itt minden esetben figyelembe kell vennünk, hogy az optikai elemek és közegek GD és GDD-je az impulzusalakra milyen hatással van. Hiszen a közegben terjedő impulzusban a vivőhullám hullámhossza egyre hosszabb az impulzus végén. Ezt a jelenséget gyakran *csörpnek* (az angol *chirp* szó után) is nevezik². A vákuumbeli terjedéshez képest az impulzus lemarad, megnyúlik. Mindezt az idő- és spektrálisan bontott mérések során korrigálnunk kell.

2.2.3. INTEGRÁLT OPTIKAI SENZOROK

A teljesen optikai elven működő fénykapcsolás (all-optical switching) megvalósítására Mach-Zehnder-interferométert (kétsugaras interferométer) vagy integrált optikai sík hullámvezetőt is használhatunk [82]. Ebben az alfejezetben egy rövid áttekintést nyújtok a későbbiekben – „*Ultragyors optikai kapcsolás bakteriorodopszinnal*” c. fejezet – használt sík hullámvezető működési elvéről, valamint egy ezen az eszközön alapuló, Optical Waveguide Lightmode Spectroscopy (OWLS) elnevezésű mérési módszerről. Ez a technika a 70-es években [83] alakult ki a többi teljes fényvisszaverődésen alapuló, felületi adszorpció mérési eljáráshoz – felületi plazmon rezonancia (SPR), teljes reflexiós Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia – hasonlóan [84-87].

A sík hullámvezető egy szubsztrátra (üveg, félvezető, stb.) felvitt vékony, nagy törésmutatójú anyagból készült réteg, amelyben (klasszikus megközelítésben) a fény a teljes visszaverődés útján terjed és a hullámvezető rétegben kialakuló intenzitás-eloszlás a réteg határfelületeiről visszaverődő hullámok interferenciája révén alakul ki (11. ábra). Kimutatható, hogy az elektromágneses tér részben behatol a szomszédos rétegekbe is, ezáltal azok törésmutatója is befolyásolja a vezető rétegben terjedő hullám paramétereit. Emiatt az ún. *evaneszcens hullám* miatt a vezető rétegbe visszaverődő fény a beesési szögtől, a hullám polarizációjától, ill. a két réteg törésmutatójától függő fázistolást szenved (Goos-Hänchen

² Más néven csiripelés: mivel a lineárisan változó frekvenciájú, hallható hanghullám a madárfütttyre emlékeztet.

„cikk-cakk“ során $2\pi m$ ($m=0,1, \dots$) fázistolást szenved. Az x irányban a fény terjedését a hullámszám vektor $k_{x,F}$ komponense szabja meg, aminek segítségével bevezethetjük a hullámvezetőre jellemző N effektív törésmutató mennyiséget:

$$N = \frac{k_{x,F}}{k} = n_F \cdot \sin \Theta = n_0 \sin \alpha + \frac{l\lambda}{\Lambda} \quad (2.15)$$

ahol λ a lézer hullámhossza, $k=2\pi/\lambda$ a vákuumbeli hullámszám, n_0 a levegő törésmutatója, l a diffrakció rendje, Λ pedig a rácsállandó. Abban az esetben, amikor a törésmutató csak a z irányban változik (step-index waveguide), a Maxwell-egyenleteket megoldva kiszámolhatjuk a fázistolást a transzverzális elektromos (TE) és a transzverzális mágneses (TM) hullámokra [90]. Ennek alapján a háromrétegű hullámvezető módusegyenleteit a következő alakban írhatjuk fel:

$$d_F k \sqrt{n_F^2 - N^2} - \arctan \left[\left(\frac{n_F}{n_C} \right)^{2\rho} \frac{\sqrt{N^2 - n_C^2}}{\sqrt{n_F^2 - N^2}} \right] - \arctan \left[\left(\frac{n_F}{n_S} \right)^{2\rho} \frac{\sqrt{N^2 - n_S^2}}{\sqrt{n_F^2 - N^2}} \right] = \pi \cdot m \quad (2.16)$$

A TE polarizációra $\rho=0$, a TM-re pedig $\rho=1$ vonatkozik. A (2.16) egyenletet N -re megoldva kapjuk az adott vezetett módus effektív törésmutatóját, a (2.15) jobb oldala pedig összefüggést teremt N és az optikai rácsra történő α beesési szög között.

A fenti elven alapul az OWLS-technika [91-93], amellyel az adlayer törésmutatójának megváltozását a vezetett módus effektív törésmutatója változásának mérésére vezethetjük vissza. A tisztán optikai elven működő fénykapcsolásnál használt OWLS paramétereit a „Tudományos eredményeim” c. fejezetben részletezem.

2.2.4. AZ IDŐBONTOTT SPEKTROSKÓPIA ALAPJAI

A molekuláris spektroszkópia területén fellépő legtöbb probléma megoldható a Born–Oppenheimer-közelítés keretein belül, amely szerint az elektron-, vibrációs és rotációs állapotok egymástól függetlennek tekinthetők, a köztük levő csatolás elhanyagolható [94]. Így a molekula egészének energiája additív módon tevődik össze az elektron gerjesztési, a rotációs és a különböző forgástengelyek vibrációs energiáiból. Egy másik egyszerűsítést is szokás kihasználni, miszerint a különböző típusú állapotok energetikailag jól elkülöníthetők. Az elektronok átrendeződéséhez például nagy energia szükséges, így ezek az UV-látható spektrális tartományba eső fotonokkal gerjeszthetők.

A molekulák energiaszint rendszerét, és az ehhez kapcsolódó spektroszkópai jelenségeket és definíciókat a 12. ábrán bemutatott Jablonski-féle termséma szemlélteti. Alapállapotban a szingulett (ábrán S-sel jelölve) elektronszerkezettel rendelkező molekulák az S_0 alapállapotú nívó megfelelő vibrációs és rotációs szintjein vannak. Foton elnyelésekor, vagyis abszorpció következtében az elektroneeloszlás a molekulában átrendeződik (fs időtartomány), és a molekula az első (S_1) vagy magasabb elektrongerjesztési állapotba kerül. Újabb foton elnyelése során az ábrán nem jelzett átmenetek is lehetségesek az egyes gerjesztett állapotok között (excited state absorption, ESA). Mivel a gerjesztett állapotba került molekulák vibrációs szintek közötti eloszlása nem feltétlenül felel meg a környezettel való termikus egyensúlynak, hőcsere történik a környezet és a molekula között. Ezt termikus relaxációnak hívjuk, a folyamatra jellemző időállandó a fs–ps tartományba esik. A gerjesztett állapot nem stabil. A lecsengés – azaz az S_0 alapállapotba történő visszatérés – a gerjesztett állapotból több módon is történhet, amely a molekulától és a környezetétől függően különböző valószínűséggel következhet be. Egyik út a sugárzás nélküli átmenet, amely során a gerjesztési energia teljes egészében hővé alakul (belső átalakulás, internal conversion, IC). Másik út a rendszerek közti átmenet (intersystem crossing, ISC), amelynél a gerjesztési energia részben megmarad, részben pedig hővé alakul.

12. ábra – Jablonski-diagram sematikus rajza [95]

Az energiát átvevő akceptor rendszer a gerjesztett molekula triplett (az ábrán T betűvel jelölve) állapota. A harmadik lehetőség a fénykibocsátás, amelyet **fluoreszcenciának** (F) vagy foszforeszcenciának hívunk, attól függően, hogy a molekula szingulett vagy triplett állapotából történik a sugárzásos átmenet az alapállapotba. A kettőt spektrumuk és időbeli lecsengésük alapján könnyen el lehet különíteni egymástól. A 12. ábrán jól látható, hogy a foszforeszcencia fotonenergiája kisebb, mint a fluoreszcenciáé, így spektruma a hosszú hullámhosszak felé tolódik. Másrészt a foszforeszcencia – a triplett állapotból a szingulett állapotba történő átmenet – tiltott, mert a spin átfordulásával jár együtt, s emiatt élettartama 5–7 nagyságrenddel nagyobb, mint a fluoreszcenciára jellemző 10^{-12} – 10^{-7} s.

2.2.4.1. FLUORESZCENCIA SPEKTROSKÓPIAI ALAPOK

A fentiekben tárgyalt termikus relaxáció következtében a fluoreszcenciához tartozó energiaátmenet mindig kisebb, mint az abszorpcióhoz tartozó. A két spektrum csúcsa közti eltolódást Stokes-eltolódásnak (Stokes shift) hívjuk [96]. A Stokes-eltolódás a környezeti feltételektől, valamint a gerjesztett állapot geometriai változásaitól függ. NADH és FAD koenzimek esetében a Stokes-eltolódás 120 illetve 90 nm (7. és 9. ábra). (Ugyanakkor nanorészecskék illetve kvantumdotok esetében például az eltolódás csak 10-20 nm.)

A fluoreszkáló anyagot nem csak abszorpciós és emissziós spektrumával szokás jellemezni. Jellemző paraméterei még a sugárzás kvantumhatásfoka és a gerjesztett állapot élettartama. A fluoreszcencia tipikusan exponenciális lecsengést követ:

$$I(t) = I_0 \cdot e^{-kt} \quad (2.17)$$

ahol $I(t)$ a fluoreszcencia intenzitásának időbeli változása, I_0 a kezdeti intenzitás $t=0$ időpontban, a k pedig a bomlási sebességi állandó (a fluoreszcencia élettartam inverze). Az $I(t)$ arányos az elektron populációval az S_1 állapotban. Mivel a gerjesztett állapot többféle módon (IC, ISC, F) kiürülhet, a teljes bomlási sebességi állandó (k_{TOT}) a sugárzásos (rad) és a nem sugárzásos ($nrad$) átmenetek összegéből adódik:

$$k_{TOT} = \sum_i k_i = k_{rad} + k_{nrad}^i = \frac{1}{\tau} \quad (2.18)$$

Tehát amennyiben bármelyik sebességi állandó nagy, az élettartam (τ) nagyon rövid lesz, és fordítva. Az egyes k_{nrad}^i értékek függhetnek a szerkezeti inhomogenitástól, ami többszörös fluoreszcencia élettartamok megjelenéséhez vezet.

A fluoreszcencia folyamat hatékonyságát a kvantumhatásfokával (η) szokás jellemezni. Definíció szerint ez a kibocsátott és elnyelt fotonok számának aránya [96], amely a (2.17) és (2.18) egyenletek alapján a következő egyszerű alakban is felírható:

$$\eta = \frac{k_{\text{rad}}}{k_{\text{TOT}}} \quad (2.19)$$

A fluoreszcenciára képes molekulák vagy fluorofórok kvantumhatásfoka széles körben változhat. Néhány festéknél megközelítheti vagy elérheti az 1 értéket (100 %), vagyis minden egyes elnyelt foton kisugárzódik. Ez esetben az alapállapotba történő lecsengés tisztán a fluoreszcenciából adódik.

Számos folyamat növelheti a nem sugárzásos átmenet valószínűségét, így csökkentheti a fluoreszcencia intenzitást. Ezeket összefoglaló néven **kioltásnak** (*quenching*) szokás nevezni [96], melyek közül a leggyakoribbak:

- ♦ Ütközéses vagy dinamikus kioltás
- ♦ Statikus kioltás
- ♦ Energia átadás révén történő kioltás
- ♦ Gerjesztett állapotban töltés átviteli reakciók
- ♦ Izomerizáció

A biokémiai alkalmazásokban a kioltás tényéből szerkezeti információkra következtethetünk [96]. Egyes kioltó anyagok (pl. oxigén, jodid, stb.) jelenléte a fluorofór közelében a fluoreszcencia csökkenése alapján könnyen kimutatható, a kioltás mérése például a kötőhelynek a kioltó számára való hozzáférhetőségéről ad felvilágosítást. A fluoreszcencia (egy másik, akceptormolekulához irányuló) FRET miatti csökkenése pedig biomolekulák asszociációs reakcióinak, konformációs változásainak vizsgálatára alkalmas. A fluoreszcencia élettartama érzékeny indikátora a molekula belső szerkezetének és a környezettel való kölcsönhatásainak. Mindezért érdemes tehát időben is és spektrálisan is nyomon követni a fluoreszcencia változását.

2.2.4.2. IDŐBONTOTT FLUORESZCENCIA SPEKTROSKÓPIA MÉRÉSI MÓDSZEREI

A PIKOSZEKUNDUM FELETTI IDŐTARTOMÁNY

A pikoszekundumos–nanoszekundumos időtartományban több fluoreszcencia mérési módszer terjedt el, ilyenek a fázismoduláción, a Streak-kamerán vagy az **időkorrelált egy-foton számláláson** (time correlated single photon counting, TCSPC) alapuló módszerek [96-98].

A fázismodulációs technika lényege abban áll [96], hogy szinuszosan modulált gerjesztő fény esetén a fluoreszcencia is szinuszos lesz. A szinuszok közötti fáziskülönbséget mérve számolható a fluoreszcencia lecsengési ideje. E módszer időfelbontása 100 ps körüli. Nagy hátránya viszont, hogy nagyon bonyolultan alkalmazható összetett kinetikák esetén, ami miatt a biológiai anyagok vizsgálatánál nem igazán alkalmazható.

A Streak-kamerán alapuló módszer [96] egylovéses technika, melynek nagy előnye, hogy spektrográffal kombinálva közvetlen szolgáltatja a mérendő adatokat. Felbontása akár ~ 1 ps alatti is lehet (Hamamatsu C6138 (FESCA-200) 200 fs!). A Streak-kamera egy olyan katódsugárcső, melyben a beérkező fényimpulzus által kiváltott fotoelektronokat térítenek el gyorsan változó elektromos tér segítségével. Ezáltal az ernyőn becsapódó elektronok térbeli eloszlása arányos lesz az impulzus időbeli eloszlásával [99]. Egyes Streak-kamerák nem csak időbontott, hanem hullámhosszbontott mérésekre is alkalmasak. Hátrányuk viszont, hogy a jel/zaj arány és a felbontás között kompromisszumot kell kötnünk, s nem elhanyagolható a magas ára sem.

Jó kompromisszumot jelent azonban a TCSPC technika, amely időfelbontása akár 25 ps is lehet (pl. Hamamatsu R3809). Ára jóval a Streak-kamera ára alatt van, és mivel a „fotononkénti számláláson” alapul, így igen érzékeny technika. Működésének lényege (13.a ábra), hogy egy a gerjesztő impulzusból származó start jellel elindítunk egy idő-amplitúdó konvertert (TAC), amelyet a fluoreszcenciából származó első foton detektálásakor leállítunk. Ezáltal megkapjuk a két esemény közötti időkülönbséget. (A gyakorlatban célszerűbb a fordított eljárás, vagyis a start jel származik a fluoreszcenciából és egy késleltető kábelén áthaladt stop jel pedig a gerjesztő impulzustól.)

13. ábra – (a) A TCSPC technika kísérleti elrendezése és (b) a TCSPC módszer alapja [100]

Ha ezt az eljárást kellően sokszor megismétljük, egy hisztogrammot kapunk, ami a beérkezett fotonok idejét, vagyis a fluoreszcencia lecsengését rajzolja ki, amelyet a 13.b ábrán láthatunk. E módszer időfelbontása a detektor típusától függ. Az aránylag olcsó lavina dióda alkalmazásával ~40 ps időfelbontás érhető el. Az időablakunk hosszát a lézerünk ismétlési frekvenciája szabja meg. Ez titán-zafír oszcillátorok alkalmazása – tipikusan 70-80 MHz körüli ismétlési frekvencia – esetén ~13 nanoszekundumot jelent.

A FEMTOSZEKUNDUMOS TARTOMÁNY – NEMLINEÁRIS OPTIKAI ALAPOK

Míg a pikoszekundum feletti időtartományban több fluoreszcencia mérési módszer terjedt el (ld. előző alfejezet), addig a femtoszekundumos tartományban csak önreferenciás eljárások alkalmazhatóak. A femtoszekundumos időfelbontású spektroszkópia minden területén alkalmazott önreferenciás módszerek közös vonása, hogy az időmérést a fénysebesség ismeretében távolságmérésre vezethetjük vissza. Ennek megfelelően a femtoszekundumos fényforrásból származó nyalábot kettéosztjuk. Az egyik nyaláb a minta gerjesztését végzi. A másik nyaláb először egy ismert hosszúságú késleltető vonalon halad át. Ezután vagy a mintán halad keresztül megmérve annak valamely optikai tulajdonságát (mint a későbbiekben ismertetett abszorpció kinetikai pumpa-próba mérések esetében), vagy a mintából a gerjesztés következtében kilépő fénnel lép kölcsönhatásba egy nemlineáris optikai folyamat során. Mindkét esetben intenzitás értékeket mérünk, melynek időbeli függése a késleltető vonal hosszának ismételt megváltoztatása segítségével rekonstruálható. A fluoreszcencia élettartam mérések esetében az egyik lehetséges önreferenciás módszer az ún. Kerr-kapuzás [101, 102], a másik pedig a frekvencia konverzió [96, 103, 104].

A Kerr-effektuson alapuló optikai kapuzás – a módusszinkronizált lézerek megjelenésével – már az 1970-es évek második felében elterjedt [101]. A Kerr-elrendezésben a fluoreszcencia fény áthalad két keresztpolarizátoron, amelyek között izotróp Kerr-közeg (rendszerint egy üveglap) van elhelyezve. A kísérleti elrendezés zárt állapotban a fluoreszcencia fényt nem engedi át. A Kerr-közegbe fókuszált kapuzó impulzus által „optikai nyitás” (önfókuszálás ill. önfázismoduláció) történik, mert az intenzitás olyan nagy, hogy az üveglap törésmutatóját megváltoztatja, melynek következtében optikai anizotrópia indukálódik/keletkezik. Ez megváltoztatja a fluoreszcencia fény polarizációs állapotát (lineárisból elliptikusra), így a fény már áthalad a második polarizátoron, és ezáltal detektálhatóvá válik [102]. Előnye, hogy ennél a módszernél nem kell fázisillesztést

alkalmazni, tehát a teljes spektrum egyszerre detektálható. Csak a detektor érzékenysége és az optikai elemek áteresztő képessége limitálja. Hátránya viszont, hogy a nemlineáris törésmutatón alapuló folyamat harmadrendű folyamat, nagy intenzitásokat követel mérés technikailag, vagyis erősített lézerrendszer szükséges hozzá.

Méréseim során a frekvencia átalakításon alapuló önreferenciás módszert használtam, melyet „fluorescence up- and/or down-conversion method” névvel illet a szakirodalom [96, 103, 104]. Én fluoreszcencia fel- és le-konverzióknak, vagy egyszerűen csak **fluoreszcencia frekvencia átalakítás**nak hívom a későbbiekben. A 14. ábra a frekvencia konverzió alapuló mérési módszert szemlélteti. Lényege abban áll, hogy a kettéosztott lézerimpulzus egyik felével (pumpa) a vizsgálandó anyagon fluoreszcenciát gerjesztünk, a másik (kapuzó, gate) nyaláb pedig késleltető vonalon halad keresztül. Ezután a kapuzó, ω_1 frekvenciájú impulzussal és a fluoreszcencia fény egy ω_2 frekvenciájú komponensével összeg- vagy különbségi frekvenciát keltünk egy nemlineáris kristályban. A keltett, új frekvenciakomponens így mintavételezi a fluoreszcencia fény intenzitását a késleltetésnek megfelelő időpillanatban. Amennyiben a kapuzó impulzussal időben végigpásztázzuk a folyamatot, megkapjuk a fluoreszcencia lecsengés kinetikáját.

14. ábra – Femtoszekundumos frekvencia konverzió alapuló fluoreszcencia mérési módszer sematikus rajza [105]

A frekvencia konverzió ez esetben egy másodrendű folyamat, megfelelő $\chi^{(2)}$ -vel rendelkező anyagot választva [106] a kristályban fellépő másodrendű polarizáció leírható (2.1) segítségével, ha azt a két különböző, ω_1 és ω_2 frekvenciákra alkalmazzuk:

$$\begin{aligned}
\tilde{P}^{(2)}(t) &= \epsilon_0 \cdot \chi^{(2)} \cdot \tilde{E}(t)^2 = \\
&= \epsilon_0 \cdot \chi^{(2)} \cdot \left[E_1^2 \cdot e^{-2i\omega_1 t} + E_2^2 \cdot e^{-2i\omega_2 t} + 2E_1 E_2 \cdot e^{-i(\omega_1 + \omega_2)t} + 2E_1 E_2^* \cdot e^{-i(\omega_1 - \omega_2)t} \right] + \\
&+ 2 \cdot \epsilon_0 \cdot \chi^{(2)} \left[E_1 \cdot E_1^* + E_2 \cdot E_2^* \right]
\end{aligned} \tag{2.20}$$

ahol

$$\tilde{E}(t) = E_1 \cdot e^{-i\omega_1 t} + E_2 \cdot e^{-i\omega_2 t} . \tag{2.21}$$

Tehát a kapuzó impulzus és a fluoreszcencia szuperpozíciója. Megfelelő **fázisillesztéssel** (lásd alább) előállítható

- ♦ a másodharmonikusa az egyik, $P(2\omega_1)$ illetve a másik, $P(2\omega_2)$ frekvenciakomponensnek; a (2.20) egyenlet első és második tagja;
- ♦ az összeg- és különbségi frekvenciájuk ($P(\omega_1 + \omega_2)$ és $P(\omega_1 - \omega_2)$); (2.20)-nek harmadik és negyedik tagja
- ♦ valamint az időben állandó DC tag (optical rectification) $P(0)$.

A gyakorlatban azonban ez a fázisillesztési feltétel csak ezen opciók egyikére teljesül.

Munkám során összefrekvenciát keltettem (*sum-frequency generation*, SFG) β -BaB₂O₄ (BBO) egytengelyű nemlineáris kristályban, így a későbbiekben csak ennek alapjaira térnék ki egy kicsit részletesebben. A geometriai elrendezést és az energia-szinteket a 15. ábrán szemléltetem.

15. ábra – Összefrekvencia keltés szemléltetése (a) és energiaszintek értelmezése (b)

Az összefrekvencia keltése parametrikus folyamat (azaz a folyamat csakis a törésmutató valós részétől függ), amelyben az energia a nemlineáris közeg hatására ($\chi^{(2)}$) az oszcilláló módusok között a csatolás miatt átcsoportosul. Az energiaáramlás iránya egy adott folyamatban a terek egymáshoz viszonyított relatív fázisától és kezdeti intenzitásától függ. A keltett új komponens intenzitása [72]:

$$I_s \approx d_{\text{eff}}^2 \cdot I_1 \cdot I_2 \cdot L^2 \cdot \text{sinc}^2 \left[\frac{\Delta k L}{2} \right], \quad (2.22)$$

ahol I_1 és I_2 a kapuzó impulzus és a fluoreszcencia intenzitásai, d_{eff} a másodrendű szuszceptibilitás tenzorból számolható, anyagra jellemző paraméter, L pedig a kristály hossza. Jól látszik, a konvertált jel intenzitása sinc^2 függvényen keresztül függ a $\Delta \vec{k} = \vec{k}_1 + \vec{k}_2 - \vec{k}_s$ **fázisillesztési paramétertől**, ahol $\vec{k}_1$, $\vec{k}_2$ és $\vec{k}_s$ az egyes nyalábokhoz tartozó hullámvektorokat jelöli. Maga a frekvenciakeltés a kristályban lokális, a keltett frekvenciakomponens a keltő nyalábbal együtt terjed az elemi komponensek szuperpozíciójának megfelelően. Ha a keltő és keltett komponensek terjedési sebessége különböző – márpedig a diszperzió miatt a három különböző frekvenciájú hullám sebessége nincs illesztve, vagyis $\Delta \vec{k} \neq 0$ –, akkor a kölcsönható terek nincsenek egymással fázisban. A kimenő jel erőssége oszcillálni fog a periódikusan konstruktív és destruktív interferencia miatt, ahogyan a kristály hosszán keresztül haladnak. A legjobb konverziós határfok elérése érdekében tehát az impulzusmomentumnak is meg kell maradnia, vagyis a $\vec{k}$ hullámvektorokra teljesül a $\sum \vec{k}_i = 0$ feltétel, ami mind a kollineáris, mind pedig a nem-kollineáris fázisillesztés esetét magába foglalja.

A fázisillesztés megvalósításának legelterjedtebb módja az optikai kettőtörő kristályok alkalmazása. Mivel a kettőtörő kristályok törésmutatója különböző a beeső nyaláb polarizációjának függvényében, a beeső nyaláb polarizációjának megválasztásával és a kristály megfelelő forgatásával biztosítható a fázisillesztés a beeső és a keltett hullámok között. Minthogy a törésmutató függ a hullámhossztól, különböző hullámhosszakon a fázisillesztés más-más irányokban teljesül. Az ordinárius (n_o) és extraordinárius (n_e) törésmutatók egymáshoz való viszonyát negatív ($n_e < n_o$) egytengelyű kristályokban – mint pl. BBO, KH_2PO_4 vagy az LiNbO_3 kristályok –, az indexellipszoiddal szemlélteti (16. ábra). A fázisillesztés irányát az ordinárius polarizációjú ω_1 és az extraordinárius polarizációjú ω_2 hullám között a $\vec{k}$ vektor határozza meg. Ez alapján megkülönböztetünk kollineáris és nem-kollineáris elrendezést.

16. ábra – Az indexellipszoid metszete BBO kritályban

Általában a keltő (ω_1 és ω_2) és a keltett (ω_3) hullámok polarizációja alapján szokás különbséget tenni a különböző típusú fázisillesztések között:

- ♦ I. típusú fázisillesztés: $E_o(\omega_1) + E_o(\omega_2) = E_e(\omega_3)$
- ♦ II. típusú fázisillesztés: $E_o(\omega_1) + E_e(\omega_2) = E_e(\omega_3)$

ahol E az elektromos mezőt jelöli extraordinárius hullám (e), valamint ordinárius hullám (o) esetében, továbbá a (2.20) alapján fennáll, hogy $\omega_1 + \omega_2 = \omega_3$. Mindezt összefoglalva a különböző típusú egytengelyű kristályok esetén az 1. táblázatban mutatom be.

FÁZISILLESZTÉS	POZITÍV EGYTENGELYŰ	NEGATÍV EGYTENGELYŰ
	$n_e > n_o$	$n_e < n_o$
I. típusú	$n_3^o \omega_3 = n_1^e \omega_1 + n_2^e \omega_2$	$n_3^e \omega_3 = n_1^o \omega_1 + n_2^o \omega_2$
II. típusú	$n_3^o \omega_3 = n_1^o \omega_1 + n_2^e \omega_2$	$n_3^e \omega_3 = n_1^e \omega_1 + n_2^o \omega_2$

1. táblázat – Az I-es és II-es fázisillesztés megvalósulása különböző típusú kristályok esetén

Munkám során I. típusú fázisillesztést használtam, ahol a BBO kristály fázisillesztési szögét (θ) az ordinárius és extraordinárius törésmutatókból meghatározhatjuk például másodharmonikusra:

$$\sin^2 \theta = \frac{\frac{1}{n_o^2(\omega)} - \frac{1}{n_o^2(2\omega)}}{\frac{1}{n_e^2(2\omega)} - \frac{1}{n_o^2(2\omega)}}. \quad (2.23)$$

Konkrétan 800 nm központi hullámhosszú impulzusnál másodharmonikus keltés esetén a fázisillesztés szöge 29.5 fok BBO kristályban.

2.2.4.3. ABSZORPCIÓS SPEKTROSKÓPIA ALAPOK

Egy minta hullámhosszfüggő **abszorbanciája** (A) vagy optikai denzitása (OD) az

$$A(\lambda) = -\log_{10} \frac{I(\lambda)}{I_0(\lambda)} \quad (2.24)$$

kifejezéssel definiált, ahol I_0 a beeső intenzitás, I pedig a mintán átmenő transzmittált intenzitás. Alapvetően, a statikus abszorpciós spektrum az UV–látható tartományon a mintánk elektron-állapotáról ad információt. Vagyis a termikus egyensúlyi állapotból való energia átmenet különbségét mérjük: az alapállapot (S_0) és a gerjesztett állapotok (S_n) közti különbséget. Emellett a detektált átmenet oszcillátor erősségéről is információhoz juthatunk.

A koncentráció (C , [M vagy mol/l]) és a hullámhossz-függő moláris extinkciós együttható ($\varepsilon(\lambda)$, [$M^{-1} \cdot cm^{-1}$]) kapcsolata az abszorbanciával a Beer–Lambert-törvény szerint [96]:

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda) \cdot C \cdot L, \quad (2.25)$$

ahol L a vizsgált minta vastagsága cm -ben.

A kémiai kötések szakadása, alakja és változásai a térben ultragyors sebességgel történnek, vagyis a pikoszekundum alatti időtartományban zajlanak. Ezek a dinamikus folyamatok magukba foglalják az elektronok és atommagok mozgását. Ezen folyamatok megfigyeléséhez nem csak széles spektrális tartományra van szükség, hanem femtoszekundumos időfelbontásra is. E témakörrel részletesen a femtokémia illetve a femtobiológia foglalkozik, többek között Ahmed H. Zewail (kémiai Nobel-díj 1999-ben) úttörő munkásságának köszönhetően [17-19]. Ő olyan, ún. pumpa–próba mérési eljárást fejlesztett ki, amellyel femtoszekundumos időskálán követhető a kémiai-biológiai reakciók időbeli lefolyása, azaz a kémiai kötések kialakulásának, bomlásának és átrendeződésének dinamikája atomi szinten.

Tranziens abszorpciós mérésekből többek között az alábbi információkhoz juthatunk:

- Félvezető lézanyagokban lezajló optikai erősítés mechanizmusa;
- Fotokémiai reakciók kinetikája és dinamikája;
- Intra- és intermolekuláris gerjesztési energiatranszfer.

2.2.4.4. AZ ULTRAGYORS TRANZIENS ABSZORPCIÓ MÉRÉSE

A *tranziens abszorpciós pumpa-próba módszer* alapelve könnyen megérthető az alábbi, 17. ábra segítségével. A gerjesztő pumpa impulzust követően, a mintát meghatározott t időpontokban (az egyik nyaláb késleltetésével) próbaimpulzusokkal világítjuk meg, és detektáljuk a minta abszorpciós spektrumának időbeli változását spektrográf és CCD kamera segítségével. Az időbeli felbontást a pumpa és próba impulzusok konvolúciója adja meg.

17. ábra – Tranziens abszorpciómérés sematikus rajza (az „FÁE” rövidítés: frekvencia átalakító egység)

Abszorpciós spektroszkópiában az adatok értelmezése az oldott anyag abszorpciójának koncentráció-függésén alapul. Ezt a kapcsolatot a Beer–Lambert-törvény alapján (2.25) felírhatjuk a mintán átmenő, transzmittált intenzitásra (T):

$$T = \frac{I(t)}{I(0)} = 10^{-\varepsilon(\lambda) \cdot L \cdot C} \quad (2.26)$$

A detektált jelek analízise tulajdonképpen abban áll, hogy összevetjük a próba intenzitását a mintán való áthaladás után gerjesztéssel illetve gerjesztés hatása nélkül. Ezt a gyakorlatban chopper alkalmazásával szokás megvalósítani, ami periodikusan blokkolja a pumpa nyalábot (ld. 17. ábra). A detektorunkkal így mérjük a próba impulzus intenzitását az alapállapotban gerjesztés nélkül (P_{OFF}), és a gerjesztett állapotban a pumpát követően P_{ON} . A (2.26) alapján a pumpa által indukált abszorpció változása:

$$\Delta A(\lambda, t) = A(\lambda, t)_{P_{\text{ON}}} - A(\lambda, t)_{P_{\text{OFF}}} = -\log \frac{I(\lambda, t)_{P_{\text{ON}}}}{I(\lambda)_{P_{\text{OFF}}}} \quad (2.27)$$

Amikor a próba impulzus nem elég stabil a mérések hosszú ideje alatt, referencia nyalábot szokás használni, ami ugyan nem halad keresztül a mintán, de a próbaimpulzussal egyidejűleg detektálható. Kísérleteim során a próba impulzust két részre osztottam a minta előtt, ahogy azt a 17. ábrán is szemléltettem.

A Beer–Lambert-törvényt alkalmazva kicsiny (néhány %) abszorpció-változás és inkohereus (sztohasztikus) folyamatok esetén

$$\Delta A(\lambda, t) = \sum_{i,j} \epsilon_{S_i \rightarrow S_j}(\lambda) \cdot \Delta C_{S_i}(t) \cdot L. \quad (2.28)$$

Ahol az $i \rightarrow j$ állapotok moláris extinkciós együtthatója $\epsilon_{i \rightarrow j}$, és ΔC_i a koncentráció (populáció) különbsége ($\equiv P_{ON} - P_{OFF}$) az S_i állapotban. Ez az egyenlet csak akkor érvényes, ha az extinkciós koefficiens időfüggetlen, azaz nincs relaxáció vagy koherens folyamat, s ekkor az idő- és hullámhosszváltozók elkülöníthetők egymástól. Leegyszerűsítve tehát megkapjuk, hogy S_i állapotban több ($\Delta C_i > 0$) vagy kevesebb ($\Delta C_i < 0$) a populáció.

Összegezve tehát a mért adatok a pumpálás hatására bekövetkező gerjesztett állapotbeli és az alapállapotbeli abszorpció közti különbséget adják meg az idő függvényében. A detektált abszorpcióváltozás mögött a következő jelenségek húzódnak meg, melyet a 18. ábrán szemléltetnek: **(1) alapállapot kifehéredése** (ground state bleaching), **(2) stimulált emisszió** (SE), valamint **(3) gerjesztett állapotbeli abszorpció** (excited state absorption, ESA).

18. ábra – A detektált tranziens abszorpciós jel lehetséges értelmezésének szemléltetése: kifehéredés (szaggatott vonal), stimulált emisszió (pontozott vonal), gerjesztett állapoti abszorpció (szürke vonal), a folyamatok összege (vastag vonal)

A 18. ábra, valamint a (2.28) egyenlet alapján tehát az alapállapot kifehéredése esetén ΔA negatív, mert a koncentráció az S_0 állapotban nagyobb pumpálás nélkül, ez a $\Delta C_{S_0} < 0$ -t eredményezi, míg L és $\epsilon_{0 \rightarrow 1} > 0$. Hasonló meggondolás alapján kapjuk, hogy SE esetén is ΔA negatív, mert a koncentráció változása ugyan pozitív, de $\epsilon_{1 \rightarrow 0} < 0$. Az indukált abszorpció (ESA) is megjelenik a gerjesztett (S_1) és a magasabb (S_n) állapotok között, ezesetben a ΔA pozitív, mert a pumpálás miatt nő a populáció, és az ϵ együttható is pozitív értékű.

Az időbontott abszorpció változásának tanulmányozására mindezek miatt az ultrarövid lézerimpulzusok alkalmazása a legmegfelelőbb, hisz így az impulzusoktól függően akár néhány 10 fs-os időfelbontással is tudjuk mérni a kinetikákat. Előny továbbá, hogy például fehér fény kontinuumot alkalmazva próba impulzusnak, a megfigyelt spektrum akár a közeli UV-től a teljes látható tartományon át (300-800 nm) információt adhat a molekula elektronállapotáról.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Biofizikai vizsgálataim egyik tárgya a bakteriorodopszin, a *Halobacterium salinarum* nevű archea egyik membránfehérjéje, amely az elmúlt 30 év számos biológiai és biofizikai kutatásának egyik legjelentősebb molekulája. A fehérje fény hatására protont pumpál az energiatermeléshez a baktérium számára. E funkciója során a bR-ben fényindukált törésmutató-változás lép fel. Ez a jelenség számos fotonikai felhasználási lehetőséget kínál, többek között az integrált optikában (tisztán optikai elven működő kapcsoló), az adattárolásban (polarizációs hologramok) és a nemlineáris optikában (másodharmonikus keltés). Másrészt több publikációban javasolták a fehérje fotoelektromos tulajdonságainak felhasználását is.

Annak ellenére, hogy számtalan helyen használják a bR-t, diszperziójára, valamint koncentrációfüggő törésmutatójára vonatkozó pontos mérési adatok az irodalomban nem állnak rendelkezésre. **(1) Célul tűztem ki ezért a bR szuszpenzió koncentrációfüggő törésmutatójának meghatározását, valamint Sellmeier-típusú diszperziós egyenletek illesztését a teljes látható hullámhossz-tartományon.** Méréseimet Dr. Osvay Károly irányítása alatt a Szegedi Tudományegyetem Optikai és Kvantumelektronikai Tanszékén található TeWaTi laborban összeállított femtoszekundumos titán-zafír lézer oszcillátorának impulzusaival végeztem, néhány mérésnél pedig nagynyomású xenon-lámpát használtam.

Napjaink kommunikációs hálózatainak adatforgalma és sebessége folyamatosan növekszik, jelenleg az 1 Tbit/s-os hálózat képviseli az elvárt sebességet és adatátviteli kapacitást. Általános vélemény, hogy a teljesen optikai adatátvitel az egyik legígéretesebb irány e cél eléréséhez. Az integrált optikai fejlesztések egyik kulcskérdése egy olyan, megfelelő nemlineáris optikai (NLO) tulajdonságokkal rendelkező anyag megtalálása, amely aktív szerepet tölthet be az integrált optikai áramkörökben. Az egyik új lehetséges jelölt lehet a bR, amely kedvező NLO tulajdonságai mellett optikai és mechanikai stabilitással is rendelkezik, és nem utolsósorban olcsó. **(2) Célul tűztem ki a bR fotociklus szubpikoszekundumos (<0.5 ps) $bR \rightarrow I$ átmenetének vizsgálatát fehérje alapú integrált optikai eszköz megvalósítása céljából.** Méréseimet OPCPA (optical parametric chirped-pulse amplification, optikai parametrikus fázismodulált impulzus erősítés) rendszerrel végeztem az SZTE Optikai és Kvantumelektronikai Tanszék TeWaTi lézerlaboratóriumában Dr. Osvay Károly és Dr. Dér András vezetésével.

Az elmúlt években az MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biofizikai Intézetében Dr. Groma Géza vezetésével részt vettem egy új femtobiológiai laboratórium felépítésében, elsősorban a komplett femtoszekundumos lézerrendszer, valamint a fluoreszcencia kinetikai vizsgálatokhoz szükséges frekvencia-konverziós és egyfoton-számláló mérőberendezés megvalósításában. A létrejött mérőberendezés alkalmas a heterogén biológiai mintákban természetesen jelenlevő vagy mesterségesen bevitt kromofórok fluoreszcenciájának széles idő- és spektrális tartományban történő vizsgálatára, és ezen keresztül a kromofórok mikrokozonyezetében fellépő változások monitorozására. A legfontosabb autofluoreszcenciával rendelkező biomolekulák között tartozik a FAD és a NADH koenzim, amelyek a légzési lánc redox folyamataiban játszanak kulcsszerepet. A FAD és a NADH fluoreszcencia kinetika időálladói széles körben alkalmazzák az egészséges és patológiás sejtek jellemzésére, ugyanakkor rendkívül kevés adat áll rendelkezésre arról, hogy a mikrokozonyezet egyes elemi paraméterei hogyan befolyásolják ezeket az időállandókat. Érdekes tehát körbejárni, hogy ezen molekulákon oldat fázisban az oldószerek polárosságának, H-kötéseinek és pH értékeinek változtatásával milyen változások lépnek fel fluoreszcencia jellemzőkben, és összehasonlítani a valós biológiai közonyezetben mérhető értékekkel. **(3) Célul tűztem ki a FAD koenzim fluoreszcencia életidejének mérését a 100 fs – 10 ns időtartományon különböző mikrokozonyezetekben (különböző oldószerekben illetve fehérjéhez kötve).** Méréseimet a Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Kutatóközpontjában végeztem, femtoszekundumos oszcillátort használva fényforrásként. A mérési módszerek ismertetésénél bővebben beszámolok e komplett fluoreszcencia mérőrendszer felépítésének részleteiről.

A NADH molekula két kromofórja között hatékony FRET folyamat tud létrejönni, melynek mértéke erősen függ a molekula konformációs állapotától. A gerjesztést követő intramolekuláris folyamatok pontosabb megértése céljából, a későbbi tervezett fluoreszcencia méréseket megelőzően **(4) céloim volt, hogy a NADH koenzim különböző (nyitott és zárt) konformációs állapotait részletesen tanulmányozzam tranziens abszorpció mérések alkalmazásával.** Méréseimet a strasbourgi CNRS-IPCMS DON (Department of Optics and Nanophotonics) intézetben végeztem Prof. Stefan Haacke irányítása alatt. Méréseim során femtoszekundumos erősített lézerrendszer impulzusait használtam.

4. KÍSÉRLETI ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Munkám során femtoszekundumos fényforrásokat használtam, melyek titán-zafír oszcillátorok, illetve erősített lézerrendszerek voltak. Ebben a fejezetben sorra bemutatom az általam használt lézerek paramétereit, és a méréseim során alkalmazott kísérleti módszereket, mérési elrendezéseimet, továbbá a felhasznált biológiai minták előkészítésének módszereit. Részletesen ismertetem az általam felépített frekvencia konverziós és egy-foton számláló technikákon alapuló komplett fluoreszcencia mérőberendezést is.

4.1. TÖRÉSMUTATÓ MEGHATÁROZÁSA FOLYADÉKOKBAN

4.1.1. KÉTKOMPONENSŰ FOLYADÉKOK TÖRÉSMUTATÓJA

A bR preparálása során nyert bíbor membrán szuszpenzió optikai sűrűsége extrém nagy ($OD \approx 17-60$), ezért a fénytörés közvetlen mérése nehéz vagy lehetetlen. Méréseimet úgy végeztem, hogy a bR szuszpenziót különböző, meglehetősen alacsony koncentrációkra hígítottam, amiből később visszaszámoltam a hígítatlan minta törésmutatóját.

Minthogy az egyedi bíbor membránok vastagsága (~ 5 nm) jóval kisebb a látható fény hullámhosszánál, a törésmutató meghatározása szempontjából a szuszpenzió olyan kétkomponensű folyadékoknak tekinthető, melynek összetevői nem lépnek kémiai reakcióba egymással. Ilyen keverékek törésmutatójának leírására az egyik leggyakrabban használt formula a Schwes (vagy Lattre) –egyenlet, amely a konkrét mintára alkalmazva [107]:

$$n_{\text{Mix}}(\lambda, V_{\text{bR}}) = \frac{V_{\text{Mix}}}{\frac{V_{\text{bR}}}{n_{\text{bR}}(\lambda)} + \frac{V_{\text{TRIS}}}{n_{\text{TRIS}}(\lambda)}}, \quad (4.1)$$

ahol n és V a törésmutatót és térfogatot jelentik, a *Mix*, *bR* és *TRIS* indexek pedig rendre a hígított bR szuszpenzióra, az izolált bíbor membránra és a TRIS pufferre utalnak. Így a puffer és az oldat törésmutatójának ismeretében az izolált bíbor membrán törésmutatója meghatározható.

Nagyon alacsony koncentrációkon ($1-50 \mu\text{mol/l}$) általában lineáris közelítést alkalmaznak [108, 109]:

$$n_{\text{Mix}}(\lambda, C_{\text{bR}}) = \alpha(\lambda) \cdot C_{\text{bR}} + n_{\text{TRIS}}(\lambda), \quad (4.2)$$

ahol C_{bR} a bR szuszpenzió koncentrációja térfogat-százalékban, $\alpha(\lambda)$ pedig illesztési paraméter (specific refractive increment). A bR törésmutatója tehát meghatározható az $n_{\text{bR}}(\lambda) = n_{\text{Mix}}(\lambda, I)$ értékeknél.

4.1.2. A bR MINTA ELŐKÉSZÍTÉSE

A mérésekhez a bR mintát a Szegedi Biofizikai Kutatóintézetből, szuszpenzió formájában kaptam. Méréseimhez ezt a mintát hígítottam különböző mértékben. A szuszpenziók aktuális koncentrációját az általánosan alkalmazott OD mérésekből állapítottam meg (2.25) alapján az $\epsilon(568 \text{ nm}) = 63000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ érték alapján [110].

A különböző koncentrációjú bíbor membrán szuszpenziókat 10 mM-os Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Sigma-Aldrich) pufferben készítettem el pH=7.0 értéken. Ennél a pH-nál a bíbor membránok aggregációja nem volt számottevő.

4.1.3. A bR TÖRÉSMUTATÓ-MÉRÉSÉNEK KÍSÉRLETI MÓDSZERE

A folyadékminta törésmutatójának meghatározását klasszikus refraktometriai módszerrel végeztem, a minimális deviáció szögének méréséből [111]. A különböző koncentrációjú bR szuszpenziókat egyenként üregprizmába tettem, majd a goniométerbe helyeztem. A szögek leolvasása kamerával történt – a nagyobb pontosság és a megfelelő infravörös érzékenység elérése érdekében. Hogy minél szélesebb spektrumon tudjak mérni, két különböző fényforrást használtam (19. ábra). A 390-780 nm közötti hullámhossztartományon 200 W-os átlagteljesítményű Xe lámpa kollimált fényét használtam. A kívánt hullámhossz-értéket SPM-2 monokromátorral állítottam be, ahol a spektrális sávszélesség mindvégig 0.4 nm volt – így a 60 μW teljesítményű megvilágítással megakadályoztam a minta gerjesztését, és a kifehéredést is kiküszöböltem [112, 113] a 390-780 nm közötti tartományon.

19. ábra – Kísérleti összeállítás sematikus rajza

A 780-880 nm közötti hullámhossztartományon történő mérésekhez 70 MHz ismétlési frekvenciájú, titán-zafír lézer oszcillátorának impulzusait használtam. A 100 nm spektrális félértékszélességű (~18 fs) fényt egy Jobin Yvon H20UV monokromátorba vezettem (ahol a spektrális sáv szélesség szintén 0.4 nm volt), majd leképeztem az üregprizma falára. Az impulzusvonulat átlagteljesítménye szűrők használatával a mintánál mindvégig 10 μ W körüli érték volt. Tekintettel az alacsony intenzitásra, a többfotonos abszorpció nem játszott szerepet, a mérés alatt a bR mindvégig alapállapotban maradt. Méréseimet 22 °C hőmérsékleten, 42% páratartalom mellett végeztem teljesen sötétben.

A mérési elrendezésben a goniométerhez érkező kvázi-monokromatikus forrásból érkező fény áthaladt a bemenő résen és a goniométer kollimátor lencséjén, így egy párhuzamos nyaláb haladt át az üres prizmán. A bemenő rést egy teleszkóppal a kamera síkjára képeztem és a goniométer skáláját nulláztam. Ezután a prizmat feltöltöttem a folyadékmintával és a minimális deviáció szögére állítottam, miközben a teleszkópból és kamerából álló egységet úgy forgattam, hogy a rés képének helye a kamerán ne változzon. Az egyes spektrumvonalakhoz tartozó elfordítás mértékét a nóniusz-skáláról olvastam le. A δ minimális deviáció abban a pontosan szimmetrikus esetben áll fenn, amikor a prizma eső fény beesési szöge egyenlő a kilépési szöggel. A Snellius–Descartes-törvényt a törőfelületekre alkalmazva, a következő egyenlőség állítható fel:

$$n_{\text{liq}} = n_{\text{air}} \cdot \frac{\sin\left(\frac{\delta + \phi}{2}\right)}{\sin\left(\frac{\phi}{2}\right)}, \quad (4.3)$$

ahol n_{liq} , és n_{air} az üreges prizmaiban levő folyadék, ill. a levegő törésmutatója, ϕ pedig a prizma két megfelelő oldala által bezárt szög. Ez utóbbi egy HeNe lézerrel végzett méréssel $59.8 \pm 0.0017^\circ$ -nak adódott.

4.2. ULTRAGYORS OPTIKAI KAPCSOLÁS BAKTERIORODOPSZINNAL

4.2.1. A PUMPA ÉS A PRÓBA IMPULZUSOK ELŐÁLLÍTÁSA

A pumpa-próba méréseimet 10 Hz-es, TW-osztályú lézerrendszer 800 nm-es impulzusaival végeztem, amelyeket két részre osztottunk (20. ábra).

20. ábra – Az erősített zöld OPCPA rendszer sematikus rajza

Az intenzívebb részből optikai parametrikus fázismodulált impulzus-erősítés (OPCPA) és fázismodulált összegfrekvencia-keltés (chirp-assisted SFG) kombinációjával [114], kompresszállást követően állítottuk elő a 150 fs időtartamú, 80 μ J energiájú pumpa impulzusokat. A kompresszállást követően a pumpaimpulzusok spektrális és időbeli jellemzőit a 21. ábrán láthatjuk.

21. ábra – Az erősített pumpa impulzus spektruma (a) és a másodrendű autokorreláció (b) 50 μ m vastag BBO használatával, belül a 12 ps-os időablak nagyítása látható.

4.2.2. A KAPCSOLÁS MEGVALÓSÍTÁSÁNAK KÍSÉRLETI ELRENDEZÉSE

Ezzel a szélessávú (21.a ábra), zöld impulzussal a bR abszorpciós sávját gerjesztettem 530 nm-es központi hullámhosszon, elindítva a fotociklust. Az SFG kristályon áthaladó, 800 nm-es, 1 μ J-os próba impulzus spektrális sávzsélessége 1800 nm^{-1} -es arany rács, egy optikai rés, illetve Fabry–Perot-interferométer (finesse ≈ 50) alkalmazásával 0.2 nm, transzformáció-limitált időbeli félértékszélessége pedig 3 ps volt (22.a ábra). Az impulzusokat megfelelő késleltetés után egy szárított bR filmmel bevont rácsos csatolású sík hullámvezetőre irányítottam (22. a és b ábra). A hullámvezetőbe a megfelelő beesési szög alatt becsatolt fény intenzitásváltozását egy gyors fotodiódával (*Thorlabs, DET10A*) és egy sokcsatornás analizátorral (*LeCroy WaveRunner 6100A*) mértem.

A méréseim során optikai hullámvezetőt (Oerlikon Balzers) használtam, amely egy üveghordozóból ($N_s \approx 1,51$) és egy vékony ($d \approx 200$ nm), nagy törésmutatóval rendelkező dielektromos anyagból (TiO_2 , $n_F \approx 1,72$) készült vezető (film)rétegből állt. A hullámvezető rétegbe való becsatolás diffrakciós ráccsal (2400 vonal/mm) történt, amelyet a szubsztrát-film határfelületre integráltak (22. b ábra). Megfelelő feltételek mellett a fény becsatolása az elsőrendű diffrakció alkalmazásával valósítható meg. A TE és TM módusok esetén csak pontosan meghatározott beesési szögeknél teljesül a hullámvezetés [40, 91].

22. ábra – (a) Kísérleti elrendezés. Az optikai kapcsolást 530 nm pumpa impulzussal valósítottuk meg, az effektust a 790 nm központi hullámhosszú próba impulzusokkal vizsgáltuk. A pumpálás hatására bekövetkező intenzitásváltozást gyors fotodiódával és oszcilloszkóppal detektáltuk. (b) Az optikai kapcsolás sematikus rajza

4.3. IDŐBONTOTT FLUORESZCENCIA SPEKTROSKÓPIAI MÉRŐRENDSZER

4.3.1. A MINTÁK ELŐKÉSZÍTÉSE

A FAD mintát a Sigma-Aldrich vállalattól rendeltem. Méréseimhez minden nap friss $3 \cdot 10^{-3}$ M-os törzsoldatot készítettem 50 mM-os, pH = 7.0 foszfát pufferben. Ezután az eredeti pufferrel, valamint dioxánnal, etanollal és DMSO-val 1:1 arányban hígítottam a FAD törzsoldatot. Így méréseim során a FAD koncentrációja mindvégig $1.5 \cdot 10^{-3}$ M volt. A kötött FAD-ot tartalmazó flavocitokróm C (*Flavocytochrome C*, FCC) fehérjét Dr. Bagyinka Csaba (SZBK, Biofizikai Intézet) preparálta.

4.3.2. A FREKVENCIA KONVERZIÓ ÉS TCSPC TECHNIKÁN ALAPULÓ MÉRÉSEK TERVEZÉSE, KÍSÉRLETI ÖSSZEÁLLÍTÁSA

Az időfelbontásos fluoreszcencia mérésekre laboratóriumunkban a közelmúltban egy titán-zafír oszcillátoron (FemtoRose 100 TUN, R&D Ultrafast Lasers, Hungary) alapuló kombinált mérési elrendezés építésében vettem részt, amely a fluoreszcencia kinetikát a frekvencia konverziós és a TCSPC módszerével egyaránt képes mérni. Részletesen a mérési elrendezést a 23. ábra mutatja. Az első módszer előnye a nagy időfelbontás (készülékünkön ~ 200 fs), azonban ennek a nemlineáris összegfrekvencia keltésen alapuló módszernek kicsi az érzékenysége. A TCSPC eljárás időfelbontása lényegesen rosszabb (készülékünkön ~ 40 ps), érzékenysége viszont nagyságrendekkel meghaladja az előző módszerét, így a két technika kombinálása jól kiegészíti egymást.

A titán-zafír oszcillátorból érkező 800 nm-es 650 mW átlagteljesítményű, p-polarizált impulzusokat egy nyalábosztó segítségével két egyenlő részre osztottam. Az egyik rész a továbbiakban kapuimpulzusként, a másik pedig optikai pumpaként szolgált. A pumpakarban haladó impulzusok polarizációját $\lambda/2$ lemez segítségével s-polarizációba forgattam, majd egy 600 μm vastag BBO (a 23. ábrán SHG) kristályban másodharmonikust keltettem I. típusú fázisillesztéssel. Így méréseim során a mintáimat gerjesztő p-polarizált impulzus hullámhossza 400 nm volt.

23. ábra – „Kettő az egyben” mérési elrendezés: időbontott fluoreszcencia mérésére alkalmas rendszer fejlesztése 100 fs – 10 ns időtartományban. A kétféle elrendezés csak a minta után különbözik, a kettő között csapótükörrel lehet átváltani. A folytonos vonal a frekvencia konverziós megoldást szemlélteti (rövid, 1 ns alatti időtartományon), a szaggatott vonal pedig a TCSPC technikát mutatja (100 ps – 10 ns közti időtartományon).

A gerjesztő fény károsító hatásának minimalizálása érdekében, a folyadék állapotú minta mindkét elrendezésben egy 1 mm vastag, négyzet alapú kapillárisban áramlott egy perisztaltikus pumpa segítségével. A mintában a fókuszált gerjesztő fény 24 μm átmérőjű volt. Az emittált fluoreszcenciát egy nagy apertúrájú (3 inch átmérőjű) off-axis parabolatükörpár (JanosTech, 300-750 nm AR coating) segítségével gyűjtöttem össze, majd fókuszáltam. A tükörpár alkalmazásának nagy előnye, hogy a tipikus leképezési hibáktól mentes (pl. színi vagy szférikus aberrációk, asztigmia, stb.). Az első tükör 5 cm effektív fókusztávolságú és 90°-ban kivágott parabola, amely összegyűjti a nagy térszögből érkező fluoreszcenciát és kollimálja. A második tükör (30 cm effektív fókusztávolság, 30°-os deviáció) azonos átmérőjű az elsővel, és a kollimált fényt az összefrekvencia keltésre használt BBO kristályra fókuszálja (a 23. ábrán SFG). A parabola-pár nagyítása 1:6 arányú, így a fókuszbán 180 μm volt a fluoreszcencia fény nyalábnak mérete.

A parabola-pár beállításánál szem előtt kell tartani, hogy méréseink során a keltett összefrekvencia komponens nem látható, valamint az első parabola fókusztávolsága kicsi az átmérőjéhez képest, így a mélységelessége is kicsi (1.6 μm). Tehát meg kell találnunk az első valamint a második parabola tükör fókuszsíkjainak nagyon precíz pozícióját, hisz az első tükör fókuszsíkjában a mintát, a másodikban pedig a BBO kristályt kell nagy pontossággal

beállítani. A pontos fókuszpontok helyének megkeresésére 10 μm pinhole-t használtam, amelyet a pumpa impulzust fókuszáló lencse mögött helyeztem el a fókuszpontban 3 dimenziós eltolón. Az intenzív nyaláb áthaladt a pinhole-on, ami kisebb volt, mint a fókuszpont. Majd a megfelelő pozíciót a pinhole 3D mozgásával kerestem meg teljesítménymérő segítségével, amelyet rögtön a pinhole mögött helyeztem el. A maximális teljesítmény megtalálása jól definiálja a fókuszpont helyét. A precíz beállítás ezután pausz papír szórt fényével történt a következő sorrendben.

1. Első parabola tükör beállítása: A pausz papírt a várható minta-pozícióba helyeztem (a pumpa impulzus fókusza), hogy szimuláljak egy pontszerű fényforrást. Majd behelyeztem a megfelelő fókusz távolságban az első parabola tükröt, és addig mozgattam, míg kb. 6 méter távolságban a reflektált fény a tükör átmérőjével megegyezett, valamint éles, kör alakú lett.

2. Második parabola tükör beállítása: A második tükröt 30 cm távolságra a kollimált fény útjába helyeztem, hogy a fényt fókuszálja. Háromszög módszerrel kimértem a 30 fokos nyílásszögét.

3. A második tükör precíz fókuszpontjának meghatározása: A második tükör fókusz síkjának (MFS) pontos helyét pinhole segítségével határoztam meg.

4. Az első tükör precíz fókuszpontjának meghatározása: Az első tükör fókusz síkjának (EFS) pontos helyzetét könnyen megtalálhatjuk egy másik lézersugár visszaküldésével. Az MFS-be most pauszt helyeztem, és a visszafele irányított szórt fény fókusza kijelöli az EFS-et. A pontos helyzetet az EFS-be helyezett pinhole beállításával határozhatjuk meg.

5. A pumpa fókuszának újradefiniálása: A pumpa fókuszának egybe kell esnie az első parabola tükör fókuszával az EFS-ben. A fókusz pozícióját korrigálhatjuk a lencsével úgy, hogy a pumpa ez előző esetben behelyezett pinhole-ra fókuszál.

A 24. ábán összefoglaltam az első és második parabola tükör fókusz síkjának meghatározását. A helyes beállítást követően az EFS-ba helyeztem a kapillárist 2D eltolón (mivel a kapillárisban áramoltatott mintáinkat az optikai tengely és a horizontális tengely mentén kell mozgatni). Az MFS helyére pedig motoros forgatón helyeztem el az SFG-t végző BBO kristályt.

24. ábra – Az off-axis parabola tükrök fókuszsíkjának meghatározása (EFS: első tükror fókuszsíkjá; MFS: második tükror fókuszsíkjá)

A FREKVENCIA KONVERZIÓ ALAPULÓ MÓDSZER

A felkonvertálós elrendezésben kapuzó (próba) impulzusként a lézer alapharmonikusából kicsatolt másik nyalábot használtam (25. ábra), mely egy 150 mm hosszú, motoros késleltető egységen (*Newport, UTS széria, 0.1 μm felbontás*) áthaladva ugyancsak a BBO kristályra fókuszálódott ($f=500\text{ mm}$, nyalábnyak $160\text{ }\mu\text{m}$). A megfelelő pontosságú beállítás érdekében a kristály mögött egy kamerát helyeztem el, amellyel megfigyelhető a két fókuszpont térbeli átfedése.

25. ábra – A frekvencia konverzió alapuló kísérleti elrendezés

A frekvencia konverzióhoz használt BBO kristály paramétereit I. típusú fázisillesztés alkalmazásánál az SNLO szoftver [115] segítségével határoztam meg (2. táblázat). A kristály hosszát ($600\text{ }\mu\text{m}$) a lézernyaláb fókuszált nyalábnyakához igazítottam [116]. Mivel a fluoreszcencia fény széles spektrális tartománnyal bír, a megfelelő frekvenciák összegzéséhez

szükséges fázisillesztést a kristály forgatásával biztosítottam. A forgatásához motoros forgatót (*Newport, URS széria, 0.001° pontosság*) használtam. A forgatás miatt a kristály θ fázisillesztési szögét a (2.23) alapján 35° -nak választottam, hogy a mérendő fluoreszcencia tartomány közepén legyen (~ 530 nm konverziójának felel meg), így a kristállyal a teljes látható tartományból érkező fluoreszcencia fényt tudjuk konvertálni.

NYALÁBJELLEMZŐK	KAPUIMPULZUS	FLUORESZCENCIA	ÖSSZEGFREKVENCIA
Központi hullámhossz [nm]	795.0(o)	530.0(o)	318.0(e)
Walkoff [mrad]	0.00	0.00	79.30
Fázissebesség [c/...]	1.661	1.674	1.669
Csoportsebesség [c/...]	1.685	1.722	1.809
GDD [fs ² /mm]	75.8	136.8	294.3
θ [fok]			36.9
Szögtolerancia [mrad°cm]			0.24

2. táblázat – A fluoreszcencia frekvencia konverzióhoz használt nyaláboknak az alkalmazott BBO kristály által meghatározott paraméterei

Az összefrekvencia keltés során a legkritikusabb pont a fázisillesztetlenség. A gyakorlatban nem-kollineáris geometriával könnyebben kiküszöbölhető ez a probléma [117, 118]. A megfelelő időfelbontás és térbeli szűrés miatt az ideális beesési szöget a két nyaláb között 12 foknak terveztem, 600 μ m vastagságú kristály esetén. A belső reflexiókat elülső és hátsó fali antireflexiós bevonatokkal küszöböltük ki. A kristály mögött réssel és UG11 sávszűrőkkel mind térben, mind spektrálisan elimináltuk a pumpa- és kapuimpulzusokat.

A kristályban keletkező összefrekvencia nyalábot egy monokromátor (Horiba Jobin Yvon, iHR550) részére fókuszáltam egy 35 mm-es fókusz távolságú fused silica lencsével (AR 250–400 nm). A monokromátor – két kimenő portja közül az – egyik kimenetén egy folyékony nitrogénnel hűtött 1024x256 pixelű CCD detektor helyezkedett el (Horiba Jobin Yvon, Symphony), biztosítva a teljes spektrum egyidejű detektálását. A spektrális bontáshoz 300 vonal/mm-es rácsot használtam.

A detektálás során a fázisillesztés biztosítása érdekében a BBO kristályt a kívánt hullámhossztartományban a rotátor forgatta. A mérések során mindvégig egy adott kristálypozícióban megmértem a kinetikát különböző késleltetéseknél, majd a kristályt a következő pozícióba mozgattam. Ennek ismétlésével a nyert adatok a fluoreszcencia

intenzitás idő- és spektrális függését tartalmazták. A kristály szögének hullámhossz kalibrációját (annak a szögnek a megállapítását, amelynél egy adott hullámhosszon az összefrekvencia keltése maximális) a 400-760 nm spektrális tartományon C102, C153 és Pyridine lézerfestékek fluoreszcenciájának mérése során hajtottuk végre.

A $t=0$ késleltetés megkeresését a lézer harmadik harmonikusának beállításával biztosítottam ($\theta \approx 42^\circ$) oly módon, hogy a pumpa nyaláb fókuszsíkjaiba pausz papírt helyeztem. A beállítást megismételtem Ludox-szal (40 wt. % colloidal silica suspension in H_2O) töltött kapilláris elhelyezésével is. Ezután az eltoló mozgásával meghatároztam a harmadik harmonikus idő- és hullámhossz szerinti eloszlását. Ezáltal megkaptam a mérőkészülék időbeli felbontására jellemző keresztkorrelációs függvényt.

A FOTONSZÁMLÁLÁSON ALAPULÓ MÓDSZER

A TCSPC elrendezésben a parabolatükrökkel összegyűjtött fluoreszcencia fényt kollimáltam (3:1 kicsinyítés alkalmazva), majd közvetlenül a monokromátor belépő részére leképeztem 150 mm fókusztávolságú lencsével (26. ábra). A gerjesztő impulzus maradványát felüláteresztő szűrőt (FGL435) alkalmazva elimináltam a fluoreszcencia fényből. A monokromátor második kimenő portján egy lavina (avalanche) fotodióda (IDQuantique, ID-100) helyezkedett el az egyfoton számlálást végrehajtó elektronikai egységhez kapcsolva (Becker&Hickl GmbH, SPC-130). Ebben az elrendezésben a fluoreszcencia kinetikákat a kívánt hullámhosszokon egymás után lehetett felvenni a monokromátor rácsának elforgatásával. A mérések kezdetén mindig kimértem a rendszer átviteli függvényét a gerjesztő, azaz a 400 nm központi hullámhosszú impulzussal, ami a mi elrendezésünk/detektorunk esetén mindvégig ~ 40 ps-nak adódott.

26. ábra – A foton számláláson alapuló kísérleti elrendezés

A felkonvertálós illetve TCSPC kísérletek során az eltoló és forgató motorok szabályzását, a monokromátor beállítását, a CCD kamera valamint a TCSPC egység adatainak kiolvasását, az adatok előfeldolgozását és grafikus megjelenítését egy egységes virtuális kezelőfelülettel ellátott Labview program (National Instruments) végezte. A teljes mérési elrendezés fotóját a 27. ábrán mutatom be.

27. ábra – A felépített komplett fluoreszcenciát mérő berendezés
(Femtobiológiai Laboratórium, Biofizikai Intézet, MTA SZBK)

4.3.3. AZ ADATOK KIÉRTÉKELÉSE

Mint az előzőekből látható, az időfelbontásos spektroszkópai mérés technikák során nyerhető nyers adatok a fényintenzitás idő- és hullámhossz függése, mely egy $I(\lambda, t)$ 2D mátrixba rendezhető. Fluoreszcencia kinetikák kiértékelése eredményeképpen a gerjesztett állapot(ok) élettartamát és a hozzájuk tartozó amplitúdók spektrális eloszlását kell meghatároznunk.

A FAD mintákon a fluoreszcencia kinetikákat mindkét (frekvencia konverzió, egyfoton) módszerrel megmértem. A felkonvertálás esetében a késleltetési pontok 1 ns-ig logaritmikus skálán egyenletesen helyezkedtek el. A zajcsökkentés érdekében az így nyert adatokon az SVD módszerrel szűrést hajtottam végre. A TCSPC módszerrel a lézer 76 MHz-es ismétlési frekvenciája 13 ns-ig terjedő mérési tartományt engedett meg, melyen utólag logaritmikus kompressziót alkalmaztam. A két mérési módszerrel nyert adatokat a 100 ps – 1 ns átfedő időtartományban összeillesztettem, és egymáshoz fűztem. Az összefűzés során megtartottam a TCSPC adatok eredeti amplitúdóját (detektált fotonok száma), és ehhez normáltam a felkonvertálással nyert adatokat. Ez biztosította a mérőkészülék spektrális átvitelére való egyszerű korrekciót a gyári adatok (monokromátor, lavinadióda) alkalmazásával. Az időtengely nulla késleltetését (t_0) Gauss-függvény és egy exponenciális konvolúciójából határoztam meg minden egyes hullámhosszon, figyelembe véve a csörpöt is. A háttérkorrekciót pedig a negatív időtartományra ($t=0$ előtt) megállapított átlagintenzitásból számoltam.

Az adatok kiértékelése ezután több lépésben történt. A lényegesebb beállítási lépéseket, az adatsorok főbb analíziseit és a kinetikák kiértékelésére vonatkozó matematikai formalizmust az alábbiakban összefoglalom.

4.3.3.1. AZ IDŐFELBONTÁS, ÁTVITELI FÜGGVÉNY

Az egyes spektroszkópai módszerek térbeli és időbeli felbontása erősen függ a kísérleti elrendezéstől. Egy adott beállításnál a készülék átviteli függvényén (IRF, Instrument Response Function) a mérőrendszernek egy végtelenül rövid impulzusra (Dirac delta jel) adott válaszát értjük, amelyről az alábbiakban feltételezzük, hogy jól közelíthető egy Gauss-függvénnyel. Az IRF a lavinadióda esetén főként elektronikai jellegű, míg a femtoszekundumos pumpa-próba illetve fluoreszcencia frekvenciakonverziós technikáknál a pumpa és próba (vagy a fluoreszcenciát gerjesztő és a kapuzó) impulzus közti keresztkorrelációs függvény (CCF, cross-correlation function) definiálja. A CCF valójában a

két impulzus ($x(t)$ és $y(t)$) átfedése a τ késleltetés függvényében. Matematikai definíciója a következő:

$$\text{CCF}(\tau) = \int_{-\infty}^{+\infty} x(t) \cdot y(t + \tau) dt \quad (4.4)$$

A frekvenciakonverziós technikánál az átviteli függvény az előbbieken leírt harmadik harmonikus keltéssel határozható meg. Esetünkben ez jól közelíthető volt egy ~ 250 fs félértékű Gauss-függvénnyel (28. ábra).

28. ábra – A frekvencia konverziós mérések átviteli függvénye

A TCSPC eljárás átviteli függvényét a pumpa impulzus közvetlenül mért válaszjeléből határozhatjuk meg [100], melynek félértéke esetünkben $38 (\pm 4)$ ps-nak adódott (29. ábra), jó egyezésben a gyári specifikációval (< 40 ps).

29. ábra – A TCSPC mérések átviteli függvénye

4.3.3.2. ZAJSZŰRÉS AZ SVD MÓDSZERREL

A szinguláris értékek szerinti felbontás (SVD, Singular Value decomposition) gyakran alkalmazott módszer a zaj csökkentésére. A módszer akkor alkalmazható, ha a zajos jel egy mátrixszal reprezentálható. Mint említettem, az időfelbontásos spektroszkópiával nyert adatok általában egy $n \times m$ -es M_{nm} mátrixba rendezhetők, ahol a sorok a különböző időpontokban, az oszlopok pedig a különböző hullámhosszon a mért intenzitás(változás)okat tartalmazzák. Az SVD felbontja az M mérési mátrixot USV^t -re, ahol az U unitér mátrix, S a diagonális mátrix és V^t egy másik transzponált unitér mátrix [119]:

$$M_{nm} = U_{nn} S_{nm} V_{nm}^t. \quad (4.5)$$

Itt a V^t oszlopai tartalmazzák az egyes spektrumokat, az U oszlopai pedig az egyes tranzienseket. Az S diagonális mátrixról megmutatható, hogy annak főátlójában levő szinguláris értékek közül a kisebbek főleg a jel zajkomponenseit reprezentálják. Ezen kicsiny szinguláris értékek elhanyagolásával, és az így nyert új SVD mátrixot inverz transzformálva a jel zajtartalma csökkenthető.

4.3.3.3. A MÉRŐRENDSZER OPTIMALIZÁLÁSA ÉS KALIBRÁCIÓJA LÉZERFESTÉKEKKEL

A biológiai minták fluoreszcenciája általában szemmel nem látható, hiszen a biológiai anyagok fluoreszcenciájának kvantumhatásfoka általában kicsi, illetve a sejtek számát nem lehet elég nagy értékre növelni ahhoz, hogy mintánk megfelelő OD-jű legyen. Ennek következtében a mérések előtt a mérőrendszerünk beállítását célszerű lézerfestékekkel optimalizálni, és erre egy jó beállítási algoritmust kell találni.

A FAD méréseket megelőzően tehát tesztméréseket végeztem Malachite Green és Coumarin 153 (C153) lézerfestékek fluoreszcencia életidejének meghatározására [120].

Először a Malachite Green festék időbontott fluoreszcencia spektrumát mértem meg a frekvencia konverziós eljárással. Ennek oka az volt, hogy az irodalom alapján a várt életidők nagyon rövidek, a fluoreszcencia (szokatlan módon az $S_2 \rightarrow S_0$ átmenet során) a néhány pikoszekundumos tartományban lecseng [121-123]. Ezért jó megoldásnak tűnt a frekvencia konverziós rendszerünk és kiértékelési algoritmusunk ellenőrzésére. A mért időbontott spektrumokat a 30. ábra mutatja. A spektrumok kiértékelése során figyelembe vettem a használt UG11-es Schott szűrők, a monokromátor rácsa, valamint a CCD kamera spektrális átvitelét, melyekkel korrigáltam a mért adatokat. Emellett a mintán átmenő 400 nm-es

gerjesztő impulzussal összegfrekvenciát keltve kimértem a CCF-et, mellyel a késleltetéseket korrigáltam. A kiértékelést követően eredményeim teljes egyezést mutattak az irodalomban közölt életidőkkel (250 és 730 fs) [124], és időbontott fluoreszcencia spektrumokkal [123].

30. ábra – A Malachit green idő- és spektrálisan bontott fluoreszcenciája

A következő lépésben olyan lézerfestéket választottam – a Coumarin 153-at –, melynek fluoreszcenciájának lecsengése a nanoszekundumos nagyságrendbe esik, és jól ismert, egyszerű molekula [125]. Szobahőmérsékleten például etanolban a fluoreszcencia kvantumhatásfoka elérheti a 80 %-ot is, korábban gyakran használták lézeraktív anyagként rezonátorokban [126]. Ennek köszönhetően ígéretes jelölt a kísérleti beállításunk optimalizálására, hiszen szemmel jól látható a fluoreszcenciája. Így segítségével a frekvencia konverziós módszernél ellenőrizni lehet a késleltető egységünk precíz beállítását, vagyis a fluoreszcencia és kapuimpulzus térbeli átfedését a frekvenciaátalakító kristályban, a teljes időablakunkban.

Méréseim során először az iménti, Malachite Green festékekkel jól beállított frekvencia konverziós eljárással mértem a kinetikákat a 100 fs – 1 ns időtartományban, majd ez követően a C153-mal.

A felkonvertálás esetében a késleltetési pontok 1 ns-ig logaritmusos skálán egyenletesen helyezkedtek el. A zajcsökkentés érdekében az így nyert adatokon az SVD módszerrel szűrést hajtottam végre. Az így nyert Coumarin 153 időbontott fluoreszcencia spektrumát a 31. ábra mutatja. Az ábrán külön ábrázoltam az első 5 ps (31.a ábra), majd az 1 ns tartomány (31.b ábra) spektrumait a jobb áttekinthetőség miatt.

31. ábra – A C153 időbontott spektruma

Méréseink során azt tapasztaltuk, hogy a Coumarin fluoreszcencia spektrumának csúcsánál, 530 nm-en (32. *a* ábra), 1–2 ps késleltetésnél a fluoreszcencia eléri a maximális értéket. Így ennél a késleltetésnél, a spektrum csúcsánál (32. *b* ábra) optimális a fluoreszcenciát mérő berendezésünk beállítása. A mérések során a spektrum csúcshintézés 2700 fotonbeütés (count) körüli értéket ért el 1.5 ps késleltetésnél 2 darab UG11-es szűrő használatával a monokromátor rése előtt. A továbbiakban minden egyes mérés előtt erre a spektrális és időbeli pontra optimalizáltam a fluoreszcencia intenzitásának beállítását mind a minta 2D mozgatásával, mind pedig a BBO kristály foragásával. Optimalizálás közben a BBO mögött elhelyezett kamerával néztem a fluoreszcencia és kapuimpulzus térbeli átfedését (a nagy kvantumhatásfok miatt szemmel látható a fluoreszcencia Coumarin esetében, míg a FAD-os mérések során nem), majd ezt követően a 317 nm-es összegfrekvencia intenzitás maximális értékére optimalizáltam, hogy a 1.5 ps késleltetésnél elérjük a 2700-as beütés értéket.

32. ábra – (a) A Coumarin 153 kinetikája 530 nm-en; (b) és spektrumának időfejlődése

Ezt követően beállítottam a második parabolatüköröt követően (26. ábrán látható módon) a csapótükör behelyezésével a fényutat a TCSPC elrendezéshez is a C153-mal, majd a monokromátor részére való leképezést. A gerjesztő impulzust (400 nm-es nyaláb beszóródását) alulvágó szűrővel (FLG430) elimináltam. Majd a fluoreszcencia spektrum maximumára optimalizáltam: az egyfoton számláló detektor 3D mozgatásával a monokromátor kimeneténél. Végül ebben az elrendezésben megmértem a gerjesztő impulzussal a rendszer átviteli függvényét, majd a Coumarin 153 fluoreszcencia kinetikáit 10 nm-es lépésközökkel (33. ábra).

33. ábra – A C153 időbontott spektruma a TCSPC elrendezéssel mérve

4.3.3.3. A BPDN ANALÍZIS (KIÉRTÉKELÉSI ALGORITMUS)

Az időbontott fluoreszcencia spektroszkópia és a FLIM nagyon hatékony módszerek a fluoreszkáló kromofórok mikrokörnyezetének jellemzésére különböző rendszerek esetében [63, 96], és a fluoreszcencia lecsengési kinetikák általában jól jellemezhetőek exponenciális eloszlással (részletesen a 2.2.4.1. fejezetben mutattam be). A gyakorlatban viszont problémát jelenthet, hogy a mérendő minták általában heterogének, ami több exponenciális megjelenését eredményezheti. Továbbá a kinetika a spektrum különböző tartományaiban is eltérő lehet, például az oldószer szolvatációs válaszána következtében. A multiexponenciális illesztés viszont közismerten rosszul meghatározott (ill posed) probléma [127, 128], az illesztés gyakran kerül lokális minimumokba, a végeredmény pedig igen érzékeny a zajokra, ráadásul általában az exponenciálisok száma sem ismert előre.

Alternatív eljárásnak kínálkozik, hogy néhány diszkrét időállandó (τ) és a hozzájuk tartozó amplitúdó keresése helyett egy széles időállandó-tartományban sűrűn elhelyezkedő, n

elemű τ_j halmazhoz keressük azokat az x_j amplitúdókat, amelyek a legjobb illeszkedést biztosítják [129]. Nyilvánvalóan a legtöbb x_j értékre zérust, vagy legalábbis igen kis x_j értéket várunk. Zajmentes esetben a probléma matematikailag az

$$y = Ax \quad (4.6)$$

egyenletrendszer megoldását jelenti, ahol y_i ($i=1\dots m$) a t_i időpontban egy adott hullámhosszon mért fluoreszcencia intenzitást jelöli,

$$A_{ij} = \exp(-t_i / \tau_j), \quad (4.7)$$

és az egyenletrendszer alulhatározott, azaz $n > m$. Zaj esetén ennek megfelelően az

$$\|Ax - y\|_2 \equiv \sqrt{\sum_{i=1}^m \left(\sum_{j=1}^n A_{ij} x_j - y_i \right)^2} \quad (4.8)$$

L^2 norma minimumát kell meghatároznunk [127, 128, 130]. Az alulhatározottság megengedi, hogy az x_i értékekre valamely regularizáló feltételt szabjunk. Esetünkben a kívánt cél az, hogy x nem zérus értékű elemeinek számát (a gyakran L^0 normának nevezett értéket) minimalizáljuk. Ehhez hasonló problémák számos más területen is felmerülnek, és az utóbbi években '**compressed sensing**' gyűjtőnéven intenzív kutatás tárgyát képezik [131]. A témakör egyik legkiemelkedőbb eredménye szerint bizonyos feltételek mellett az L^0 normával nyert regularizált megoldás numerikusan jól közelíthető az

$$\|x\|_1 \equiv \sum_{i=1}^n |x_i| \quad (4.9)$$

L^1 normával végzett regularizációval, ami számítástechnikailag az előzőnél lényegesen egyszerűbb feladat [132]. Zajmentes esetben megoldandó tehát az úgynevezett '**Basis Pursuit**' probléma

$$\min : \|x\|_1 \quad Ax = y, \quad (4.10)$$

zaj esetén pedig az ennek megfelelő '**Basis Pursuit Denoising**' (BPDN) probléma

$$\min : \|Ax - y\|_2^2 + \lambda \|x\|_1, \quad (4.11)$$

ahol λ a regularizáció mértékét meghatározó paraméter [133].

SZÁMÍTÁSI MÓDSZEREK

Groma Géza a fentiekben meghatározott problémák megoldására először különböző zajszinttel szintetikusán generált adatokon tesztelte a BPDN-eljárást. A tényleges mérési adatok kiértékelésére a **l1_ls** programot használtuk (a 'Compressed Sensing Resources' weboldalon elérhető programcsomag [134]), a különböző hullámhosszakon mért adatokra egyenként alkalmazva. A λ , regularizációs paraméter értékét úgy állítottuk be, hogy az illeszkedés a lehető legjobb legyen, de a lecsengési szakaszban nem elhanyagolható értékű negatív amplitúdók ne jelenjenek meg. Az $m = 51$ számú t_i mérési időpont logaritmikusan egyenletesen skálán helyezkedett el (ld. bővebben az 5.3.3. fejezetben).

4.4. AZ ABSZORPCIÓKINETIKA MÉRÉSHEZ ALKALMAZOTT PUMPA-PRÓBA RENDSZER

4.4.1. A MINTA ELŐKÉSZÍTÉSE ÉS TULAJDONSÁGAI

A méréseknél mindvégig 3.0×10^{-4} M koncentrációjú NADH (Sigma-Aldrich) mintákat használtam, amelyeket minden mérés előtt frissen készítettem. A vizes oldatokban pufferként 0.1 M PIPES-t alkalmaztam pH = 7.0 értéken, mert az irodalom alapján a NADH stabilitása e puffer esetén optimálisabb [135]. A minták stabilitását abszorpciós spektrumuk alapján ellenőriztem. A nyitott és zárt konformációs állapotban lévő NADH molekulák száma metanol hozzáadásával szabályozható [59]. Ennek megfelelően 0, 50, 70 és 80 % metanol koncentrációk esetében vizsgáltam a kinetikákat.

4.4.2. A KÍSÉRLETI ELRENDEZÉS

A femtoszekundumos abszorpciókinetikai méréseket standard pumpa-próba módszerrel végeztem a strasbourgi IPCMS DON csoportjánál. A mérések során az adenin csoportot gerjesztettem 266 nm központi hullámhosszú pumpa impulzussal, amelyet az erősített titán-zafír rendszer (5 kHz, 40 fs, 500 μ J) impulzusainak harmadik harmonikusának előállításával biztosítottam. A pumpa átlagteljesítménye 640 μ W, a minta fókuszában a nyalábnyak mérete pedig 118 μ m volt. A próba nyalábot kalcium-fluorid tömbben való fehér fény kontinuum (WLC) keltéssel állítottam elő a 330-630 nm spektrális tartományban (33. ábra). Ennek nyalábnyak mérete a mintán 36 μ m volt. Ahogy a 33. ábrán is látható, az UV-látható tartományon a 4a, KG1 és OD 0.7-es jelzésű szűrők esetén megfelelően széles a WLC spektrum, így ezen szűrők használatával vizsgálni tudjuk mind a nikotinamid csoport gerjesztett állapot abszorpciójának (350-400 nm), mind pedig a stimulált emissziójának (450-550 nm) időbeli fejlődését.

34. ábra – A próba impulzus spektruma különböző szűrők alkalmazásával

A kísérleti összeállítást a 35. ábrán mutatom be. A minta előtt a kontinuumot 2 részre osztottam, egyik volt a próba nyaláb, másik pedig a méréseim során referenciának szolgált az abszorpció-változás pontos meghatározásához. A minta után a próba és referencia-nyalábot monokromátorba vezettem, és hűtött CCD kamerával detektáltam a spektrumokat. A kinetika mérések időbeli felbontása a hullámhossztól függően 50-100 fs volt. Mintatartónak egy 0.5 mm átmérőjű négyzetes kvarc cellát használtam, melyben a folyadékmintákat egy perisztaltikus pumpa segítségével áramoltattam.

35. ábra – A pumpa-próba mérés elrendezése (SHG: másodharmonikus keltés, 400 nm; THG: harmadik harmonikus keltés, 266 nm; WLC: fehérfény kontinuum, 330-630 nm)

4.4.3. ADATKIÉRTÉKELÉS A TRANZIENS ABSZORPCIÓS SPEKTROSKÓPIÁBAN

Az időfelbontásos fluoreszcenciához hasonlóan, a tranziens abszorpciós adatok kiértékelése során a mért $\Delta A(\lambda, t)$ 2D mátrix elemzésével célunk az, hogy a gerjesztett állapot(ok) élettartamát és amplitúdóinak spektrális eloszlását meghatározzuk, ezáltal információhoz jussunk a molekulában lezajló fotofizikai, fotokémiai változásokról. Ehhez azonban ebben az esetben is néhány korrekciót és zajszűrést kell elvégeznünk. Az alábbiakban röviden ismertetem a lényegesebbeket sorban:

1. Átviteli függvény, IRF
2. SVD zajszűrés
3. Spektrális kalibráció
4. Csörpkorrekción
5. Oldószer válasza
6. Globális analízis

Az 1-2 lépés azonos az előző fejezetben ismertetett módszerekkel, a spektrális kalibrációt pedig a mérési program már magába foglalta.

CSÖRPKORREKCIÓ

Mivel a WLC nagy spektrális sávszélességgel rendelkezik, az anyagi diszperzió hatása, valamint a pumpálás hatására létrejövő kétfotonos abszorpción (two photon absorption, TPA) hatása is jelentős, ami azt eredményezi, hogy az oldószernél mért TPA jelnél a vörös komponens lemarad a kék komponensekhez képest. A 36. ábrán a WLC időbeli megnyúlását szemléltetem 80% metanol-tartalmú PIPES puffer esetén mért TPA spektrummal. Jól látható, hogy a spektrum piros oldala időben lemarad, azaz erősen csörpölt a WLC impulzus. Az alábbiakban röviden bemutatom az általam alkalmazott csörpkorrekción.

A korrekciót Matlab-ben végeztem. Mivel több megoldás is alkalmazható e korrekción elvégzésére, én azt mutatom be, amellyel korrigáltam a mérési adatsoraimat. Kiszámoltam, hogy a WLC terjedése közben a kalcium-fluorid tömb (CaF_2) 0.15 mm vastagsága, és a kvarc küvetta (SiO_2) falainak összesen 0.2 mm vastagsága összesen mekkora csörpöt okoz, majd a késleltetések függvényében kapott diszperziótól mentesítettem adatsoraimat.

36. ábra – A PIPES puffér időbontott spektruma 80 % metanol jelenléte esetén

A csörpkorrekciónál a CaF_2 és a SiO_2 anyagok Sellmeier-egyenleteit használtam alapul [136]:

$$n_{\text{SiO}_2} = \sqrt{1 + \frac{(\lambda^2 \cdot c_1)}{(\lambda^2 - c_2^2)} + \frac{(\lambda^2 \cdot c_3)}{(\lambda^2 - c_4^2)} + \frac{(\lambda^2 \cdot c_5)}{(\lambda^2 - c_6^2)}} , \quad (4.12)$$

valamint

$$n_{\text{CaF}_2} = \sqrt{1 + \frac{(\lambda^2 \cdot k_1)}{(\lambda^2 - k_2^2)} + \frac{(\lambda^2 \cdot k_3)}{(\lambda^2 - k_4^2)} + \frac{(\lambda^2 \cdot k_5)}{(\lambda^2 - k_6^2)}} . \quad (4.13)$$

Az egyenletekben λ μm -ben értendő, c_n és k_n konstansok ($n=1\dots 6$) pedig a két anyag Sellmeier-együtthatói, amelyeket a 3. táblázatban adok meg [137, 138].

n , index	c_n	k_n
1	0.6961663	0.5675888
2	0.0684043	0.050263605
3	0.4079426	0.4710914
4	0.1162414	0.1003909
5	0.8974794	3.8484723
6	9.896161	34.649040

3. táblázat – A SiO_2 (c_n) és a CaF_2 (k_n) Sellmeier-koefficiensek értékei

Figyelembe véve tehát a WLC terjedése közben a két anyag törésmutatójából származó fázissebességeket, valamint egy kezdeti 'offset'-et, amely a $t=0$ időpont (a pumpa és próba impulzusok tökéletes időbeli átfedése, ahol a CCF maximális) pontatlanságából adódik, a végső polinom

$$P(\lambda) = \frac{n_{\text{SiO}_2} \cdot d_{\text{SiO}_2}}{c_0} + \frac{n_{\text{CaF}_2} \cdot d_{\text{CaF}_2}}{c_0} + \text{offset} \quad (4.14)$$

alakú, ahol c_0 a fénysebesség vákuumban, d az anyagban megtett úthossz, n pedig az adott anyag törésmutatója.

Mivel a törésmutató felírható $(n_0 + \delta n)$ alakban, ahol az n_0 konstans, így számolásaimnál csak az adott hullámhossztartományhoz tartozó diszperziót (δn) vettem figyelembe. Így csak egy egyszerű polinomillesztést hajtottam végre (4.14) alapján kicsiny offset értékekkel: t_0 értékét a kísérlet alapján (IRF-ből) le tudjuk rögzíteni. A korrigált időbontott spektrumot a *Tudományos eredményeim* című fejezetben mutatom be (70. ábra).

OLDÓSZER VÁLASZA ÉS LEVONÁSA

Alacsony pumpaintenzitásoknál az oldószerünk válasza a TPA-s és keresztfázis-modulációs jeleket is tartalmazza, amelyektől mentesítenünk kell az adatsorainkat. A gyakorlatban az oldószerünk válaszát az alábbi módon, az f faktor illesztésével szokás figyelembe venni (az illesztés jóságát a $t=0$ érték korrekció utáni megtartása, valamint a $t<0$ tartományon a háttérszint megtartása ($\Delta A=0$) jelenti):

$$\Delta A_{\text{MINTA}} = \Delta A_{\text{MINTA+OLDÓSZER, mért}} - f \cdot \Delta A_{\text{OLDÓSZER, mért}} \quad (4.15)$$

Itt kihasználtuk azt az egyszerűsítő feltevést, hogy a mérések során a pumpa impulzus energiája nem változott. Ebben az esetben kimutatható [139], hogy az illesztési faktor a mintánk OD-jétől az alábbi módon függ:

$$f = \frac{1 - 10^{-\text{OD}}}{2.3 \cdot \text{OD}} \quad (4.16)$$

Esetünkben a minták 0.3–0.4 OD-jának megfelelően $f=0.65–0.72$ értékek közé esik, amelyet illesztéssel határoztam meg minden egyes metanol koncentrációnál.

GLOBAL ANALÍZIS

A globális analízis módszere azon a feltevésen alapul, hogy a lecsengési idők függetlenek a hullámhosszaktól. Ezzel a feltevéssel egyidejűleg illeszthetünk az 1-5. korrekciók elvégzése után kapott néhány karakterisztikus tranziensre (például abszorpciós és emissziós maximumoknál) exponenciálisok összegét, és kiszámolhatjuk az egyes amplitudókat és időállandókat. Majd mindezt kiterjesztjük a teljes spektrális tartományra úgy, hogy a kapott időállandókat lerögzítjük, és csak az amplitudókat illesztjük minden egyes hullámhosszon. Egy adott időállandóhoz tartozó amplitudó hullámhosszfüggését amplitudó spektrumnak nevezzük (DAS, decay-associated spectrum). Tranziens abszorpciós mérésnél a pozitív DAS abszorpció, a negatív DAS pedig az SE lecsengését jelenti. A gyakorlatban tehát a $\Delta A(t, \lambda)$ adathalmazunk

$$\Delta A(\lambda, t) = \sum_{i=1}^M (e^{-k_i t} \otimes \text{IRF}(t)) \cdot \text{DAS}_i(\lambda) \quad (4.17)$$

alakú, amiből az IRF és az exponensek konvolúciójából megkaphatjuk a $\text{DAS}(\lambda)$ -okat.

5. TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

5.1. A bR SZUSZPENZIÓ TÖRÉSMUTATÓJÁNAK MÉRÉSE

Méréseim során először a TRIS puffer törésmutatóját, majd a bR szuszpenziók törésmutatóját határoztam meg 0 – 76 μM koncentráció-tartományon. A minimális deviáció szögét a normális diszperziós tartományon 10 nanométerenként mértem, az abszorpciós tartományon viszont – ahol a bR minta anomális diszperziót mutat (500-600 nm) – 5 nanométerenként. Minden egyes mért hullámhosszon három egymást követő mérést végeztem, így a szögmérés összegzett standard deviációja 0.0017° értéknél kisebb volt [111]. A minimális deviáció szögének ismeretéből a (4.3) egyenlet alapján meghatároztam a törésmutató értékeket, ahol a levegő diszperzióját az aktuális laboratóriumi állapotra nagy pontossággal kiszámoltam a hőmérséklet- és nyomásfüggő Sellmeier-egyenletből [140].

A mérés hibáját végső soron a szögmérés, ill. maga a törésmutató értéke befolyásolja. A szögmérés hibája az üreges prizma gyártási hibáiból és a goniométer pontosságából adódik, esetünkben ez 0.09 szögperc volt.

A törésmutató meghatározásakor a hibaterjedés az üreges prizma, ill. a mért minimális deviáció szögétől a következőképpen függ:

$$dn = \left| \frac{\partial n(\delta, \varphi)}{\partial \delta} \right| d\delta + \left| \frac{\partial n(\delta, \varphi)}{\partial \varphi} \right| d\varphi, \quad (5.1)$$

Ebből a törésmutató-mérés teljes hibája esetünkben 0.0004-től (a közeli infravörösben) 0.0003-ig (a közeli ultraibolyában) változott.

5.1.1. A TRIS PUFFER TÖRÉSMUTATÓJA

A 37. ábrán a minimális deviáció szögének méréséből és a levegő pontos törésmutatójából meghatározott törésmutató hullámhosszfüggése látható a TRIS (10mM, pH = 7.0) puffer esetén. A levegő törésmutatója hatásának demonstrációja céljából a 37. ábrán szemléltetem, hogy az $n_{\text{air}} = 1$ közelítésnél mennyire eltérő értékeket kapunk a pontos értékekhez képest.

37. ábra – TRIS puffer törésmutatója levegőkorrekcióval (kék) és korrekció nélkül (fekete)

Egy anyag törésmutatójának könnyebb kezelése érdekében a mért adatokra diszperziós egyenleteket szokás illeszteni. A létező sokféle képlet közül két okból is a Sellmeier-típusú egyenletet választottam. Először is, ez az egyetlen szemi-empirikus diszperziós egyenlet, azaz az alapvető formája levezethető az abszorpció és diszperzió Lorentz-féle elméletéből. Másodszor, mivel mind a TRIS, mind a bR minta relatíve sok vizet tartalmaz, ezért törésmutatójuk várhatóan közel lesz a desztillált víz törésmutatójához, ami nagyon pontosan illeszthető a Sellmeier-típusú egyenlettel az ultraibolyától a közeli infravörösig [141]. A TRIS ugyan a kémiában, biológiában és biofotonikában népszerű és elterjedt puffer, egyéb, a kémiában gyakran használt oldószerekkel ellentétben [142] optikai tulajdonságai – mint például törésmutatója és diszperziója – nem ismertek.

A TRIS puffer esetén a Sellmeier-egyenletet a (2.10) alakban írható fel. Az egyenletet a lehető legegyszerűbb formájában használva először egy egytagú ($i=1$) kifejezést illesztettem a feltüntetett együtthatókkal (4. táblázat).

TRIS (10mM, pH 7.0)	$A_1 (10^5)$	$A_2 (10^9)$	λ_1 [nm]	λ_2 [nm]
Egytagú Sellmeier	7.363698414	—	101.0293566	—
Kéttagú Sellmeier	7.757363056	1.17425171286	98.6571625	1040.2402896

4. táblázat – A Sellmeier-egyenlet együtthatói normál légköri nyomáson és 22 °C hőmérsékleten TRIS pufferre

Ebben az esetben az illesztés eltérése a mért adatoktól (38. ábra) elfogadhatatlanul nagy, azonban egy kéttagú, azaz négyparaméteres Sellmeier-formula már nagyon jól illeszkedik. Utóbbi esetben a mért és illesztett értékek közti eltérés kisebb, mint $1 \cdot 10^{-4}$, ami jóval a $4 \cdot 10^{-4}$ -es mérési pontosságon belül van.

38. ábra – A mért és illesztett törésmutató-értékek eltérése TRIS puffernél

5.1.2. A bR SZUSZPENZIÓ KONCENTRÁCIÓFÜGGŐ TÖRÉSMUTATÓJA

A bR törésmutatója meghatározásának második lépéseként 10, különböző mértékben hígított bR szuszpenzió törésmutatóját mértem meg. A jobb láthatóság kedvéért a 39. ábrán csak 4 koncentrációnál ábrázoltam a 390 és 880 nm között mért törésmutató-értékeket. Amint látható, ilyen alacsony koncentráció esetén az oldatok normális diszperziót mutatnak az egész hullámhossz-tartományon, a bR 560 nm körüli anomális diszperziója nem figyelhető meg.

39. ábra – Különböző koncentrációjú bR oldatok mért törésmutatója

A 40. ábrán két hullámhosszon (562, 800 nm) mért törésmutató-értékek láthatóak az összes mért koncentráció esetén. A koncentráció-függés teljes hullámhossz-tartományra vonatkoztatott hasonlósága ellenére a kiemelt hullámhosszakat az alapján választottam, hogy az egyik a sötétadaptált bR abszorpciós maximuma (562 nm), míg a másiknál (800 nm) egyáltalán nem várható abszorpció. Mindkét esetben, ahogyan az összes többi hullámhosszon is, a mért törésmutató-értékek egyenesen arányosak a bR oldat koncentrációjával.

40. ábra – A bR oldatok mért törésmutató-értékei a koncentráció függvényében két különböző hullámhosszon (562nm: a bR fő abszorpciós vonala; 800 nm: abszorpció-mentes).

A teljes méréssorozatot megismételtam, kezdve egy friss, fagyasztott bR minta felolvasztásával és hígításával, a 4. fejezetben leírt módon. A mért törésmutatók kiválóan egyeztek az előző méréssorozat eredményeivel.

A polarizáció hatásának vizsgálatához a lézerfény polarizációját egy $\lambda/2$ lemez segítségével forgattam. Alacsony koncentrációkon nem tapasztalható törésmutató-különbség a két ortogonális polarizáció esetén. Csak az általunk használt legmagasabb koncentrációnál (76 μM) tapasztaltunk eltérést, az s-polarizált fényre kapott értékek kicsivel kisebbek voltak a p-polarizáltra kapottaknál. A mért eltérés a mérési hiba nagyságrendjében volt, ez alátámasztja, hogy szuszpenzióban nincs kitüntetett irány, így nem várható polarizációs hatás.

5.1.3. AZ IZOLÁLT BÍBOR MEMBRÁNOK TÖRÉSMUTATÓJA

Az előzőekben leírtak után kiszámoltam a bR saját – azaz az izolált bíbor membránok – törésmutatóját a különböző mértékben hígított bR szuszpenziók mért törésmutatójának értékéből, és az előzőekben meghatározott TRIS puffer négytagú Sellmeier-egyenletéből ((2.10) egyenlet, $i=2$). A törésmutató-értékeket a Schwers-egyenletből (4.1) is, valamint a lineáris közelítésből (4.2) is meghatároztam a teljes spektrális tartományon, a kapott eredményeket a 41–42. ábrák mutatják.

41. ábra – A bR saját törésmutatója a Schwers- és a Sellmeier-egyenletből

42. ábra – A lineáris közelítésből és az illesztett Sellmeier-egyenletből számolt bR-törésmutató

Miután a törésmutatót az egész látható – közeli infravörös tartományon megmértem, egy, a mérési adatokra jól illeszkedő diszperziós egyenletet kellett keresnem. Mivel a sötétadaptált bR-nek 560 nm körül abszorpciós maximuma van, a hagyományos Sellmeier-típusú képlet (mint (2.10)) nem alkalmazható közvetlenül. Ezért a különböző képletek közül a kéttagú Sellmeier-egyenlet szemi-empirikus változatát választottam a következő formában:

$$n(\lambda)^2 - 1 = \frac{A_0}{1 + (\lambda^{-2} - \lambda_0^{-2})} + \sum_{i=1}^2 \frac{A_i}{\lambda^{-2} - \lambda_i^{-2}}, \quad (5.2)$$

ahol A_0 és λ_0 az abszorpció erősségére és helyére vonatkozó paraméterek. Az 5. táblázat tartalmazza mindkét esetre az (5.2) egyenlet illesztéséből kapott paramétereket. Az illesztési eljárás mindkét esetben jól adta vissza a λ_0 abszorpciós sáv helyét, a mért és illesztett értékek közti eltérés kisebb volt, mint 0.001 (43. ábra). Amint látható, esetünkben gyakorlatilag nincs különbség a Schwers-formula és a lineáris közelítés pontossága közt.

43. ábra – A bR mért és illesztett törésmutató-értékeinek eltérése

Az általunk meghatározott tiszta bR törésmutatója alapvetően különbözik a száraz mintán mért, $n = 1.52$ értékektől [143]. Ennek oka a sejtmembrán magas víztartalma, ami a mintakészítés után is megmarad, így a bR oldat törésmutatójának értéke közel van a desztillált vízéhez [141].

bR szuszpenzió	$A_0(10^{11})$	λ_0 [nm]	$A_1(10^4)$	$A_2(10^8)$	Λ_1 [nm]	Λ_2 [nm] (10^3)
Schwes-egyenlet	6.838	559.8099	2.40692062	8.1543917	58.928371	1445.266549
Lineáris közelítés	6.838	559.8099	2.42382645	7.5111726	58.540103	1012.51599

5. táblázat – A bR Sellmeier-egyenletének együtthatói normál légköri nyomáson és 22 °C hőmérsékleten

5.1.4. ÖSSZEFOGLALÁS

Méréseim során vad típusú bR (bR_{wt}) mintákat vizsgáltam szuszpenzió formájában, amelyet TRIS (10 mM, pH = 7.0) pufferrel hígítottam a 0-80 μ M közti koncentráció tartományban. Először megmértem a TRIS puffer törésmutatóját, majd a bR szuszpenziók törésmutatóját különböző koncentrációkon 390-880 nm közti hullámhossztartományon, és meghatároztam a bR_{wt} törésmutatójának koncentrációfüggését. Elsőként adtam meg a TRIS puffer és a bR szuszpenzió Sellmeier-együtthatóit [144].

1. tézispont: A minimális deviáció szögének méréséből meghatároztam a bR törésmutató értékeket. Először meghatároztam a TRIS puffer törésmutatóját, majd a bR szuszpenziók törésmutatóját különböző koncentrációkon 390-880 nm közti hullámhossztartományon. Elsőként adtam meg a TRIS puffer és a bR szuszpenzió Sellmeier-együtthatóit.

5.2. ULTRAGYORS OPTIKAI KAPCSOLÁS BAKTERIORODOPSZINNAL

Ormos és munkatársai a korábbi munkáik során kísérletileg kimutatták, hogy a fényindukált átmenet a $BR \rightarrow M$ állapotok között alkalmas optikai kapcsolásra [40]. Ez az átmenet azonban relatíve lassú, a 10 μs tartományba esik. Munkánk során megvizsgáltuk és kísérletileg igazoltuk, hogy a jóval gyorsabb (néhány ps) $BR \rightarrow K$ átmenet is eredményesen használható optikai kapcsolásra [34, 145]. Sőt, egy lépéssel továbbmenve, a bR eddig ismert leggyorsabb (< 0.5 ps) $BR \rightarrow I$ átmenetét is sikerült használni fénykapcsolásra, mellyel a 1 THz kommunikációs sebesség elérése lehetővé válhat.

5.2.1. MÉRÉSI EREDMÉNYEK

A 22. ábrán bemutatott kísérleti elrendezésben a próba impulzus nagy spektrális sávszélessége miatt Fabry-Perot-interferométert építettünk, hogy – a rácsos becsatolás megfelelő pontosságú detektálásához szükséges – keskeny (0.2 nm alatti) pumpa impulzust használhassunk a mérések során. A 44. ábrán látható a próba impulzus teljes spektruma Fabry-Perot-interferométer után (44. a ábra), valamint kinagyítva a kísérleteinkhez használt 790 nm-es központi hullámhosszú, keskeny sávszélességű nyaláb spektruma (44. b ábra).

44. ábra – A próba impulzus spektruma a Fabry-Perot-interferométer után (a) valamint a 790 nm-es, keskeny sávszélességű rész spektrumának nagyítása (b), amelyet a mérések során mindvégig használtam

A 0.18 nm sávszélességű próba impulzust a hullámvezetőbe irányítottam, majd oszcilloszkópon megkerestem az intenzitás maximum segítségével a helyes becsatolási szöget

a 790 nm-es (44. b ábra) impulzusokra. Méréseim során az optikai kapcsolás demonstrálására a TM rezonanciacsúcsot használtam -19.65 fokos becsatolási szögnél. Mielőtt eredményeimet ismertetem, röviden felvázolom a várható effektust.

A gerjesztést követően a bR törésmutató-változásának hatására a becsatolási szög megváltozik, így a hullámvezetőbe csatolt módus intenzitásának változását várjuk (amplitúdókapcsolás). A becsatolt módus intenzitását a rezonanciacsúcs inflexiós pontjainak közelében (például az intenzitás-félértékeknél) érdemes megfigyelni, hisz itt várható a legnagyobb intenzitás-változás. Ezt az elképzelést a 45. ábrán mutatom be.

45. ábra – A szubpikoszekundumos mérés demonstrálása. A hullámvezetőbe csatolt fény intenzitásának rezonanciacsúcsa eltolódik a negatív szögek irányába az adlayer hipotetikus törésmutatójának csökkenése miatt. A piros nyíl jelzi a várható intenzitás változását a rezonanciacsúcs félértékénél, a spektrum vörös oldalán.

A BR és I állapotok abszorpciós spektrumából a Kramers–Kronig-reláció alkalmazásával kiszámolható (2.9), hogy 790 nm hullámhosszon (0.18 nm sávszélesség mellett) mekkora és milyen előjelű a törésmutató változása. Esetünkben ez az érték -0.002 körüli, amelyből kiszámolható, hogy az adott hullámhosszra vonatkozó becsatolási szög negatív irányba tolódik el. Tehát ha a 45. ábrán látható helyen (piros nyíl) vizsgáljuk a becsatolt intenzitást, a bR konformációjának változása miatt bekövetkező törésmutató-változás gerjesztés hatására a jelzett intenzitás csökkenését fogja eredményezni.

Méréseink során 150 fs impulzusidejű pumpa impulzussal gerjesztettük a bR fotociklusát, ezt követően különböző késleltetéseknél detektáltuk a félértéknél fellépő relatív intenzitás-változásokat. Ez a -19.65 fokos becsatolási szög esetében az óramutató járásával ellentétes (counter clockwise, CCW) irányban vett félértéket jelenti a kísérleti

összeállításunkban. A pumpa és próba impulzusokkal 50 μm vastag BBO kristályban összefrekvenciát keltve megkerestük $t=0$ késleltetést. Majd e nulla késleltetésnél a CCW intenzitásmaximum félértékszélességénél a mért relatív intenzitásokat a 46. a ábrán mutatom be. Látható, hogy a pumpa impulzus (zöld pontozott vonal) nulla körül ingadozik, vagyis nem szóródik be a méréseink során. A becsatolt próba impulzus (fekete szaggatott vonal) intenzitása pumpálás hatására lecsökken, melyet a pirossal jelzett folytonos vonal jelez. Ezt úgy is értelmezhetjük, hogy az adlayer törésmutatója gerjesztés hatására csökken. Ez a hatás összhangban van azzal a feltevésünkkel, hogy ezesetben az amplitudó-kapcsolást az I intermedier uralja a fotociklus során, mivel az I állapot fő abszorpciós csúcsa jelentősen kékeltolódott ($\lambda_{I,\text{max}}=460\text{ nm}$) a BR alapállapothoz képest ($\lambda_{\text{BR,max}}=570\text{ nm}$).

Mintegy ellenőrzésképpen megnéztem a másik oldali intenzitásfélértéknél (clockwise, CW) is az optikai pumpálás hatását a becsatolt próba impulzusra. A 45. ábrának megfelelően itt intenzitásnövekedést kellene tapasztalnunk, amit a 46. b ábrán látható mérési görbék is megerősítenek: a mért próbaimpulzus intenzitása pumpálás hatására megnő a spektrum rövidebb hullámhosszhoz tartozó oldalánál (piros folytonos vonal).

46. ábra – A detektáló fotodióda válaszejele a próba impulzus nulla késleltetésénél. **(a)** A hullámvezetőbe csatolt próba impulzus intenzitása a rezonancia csúcs hosszabb hullámhosszú félértékénél mérve pumpálással (folytonos piros) és pumpálás nélkül (szaggatott fekete). **(b)** A becsatolt próba impulzus intenzitása a rezonancia csúcs félértékének rövidebb hullámhosszhoz tartozó oldalánál mérve pumpálással (folytonos piros) és pumpálás nélkül (szaggatott fekete).

5.2.2. ELMÉLETI MEGGONDOLÁSOK

Ahhoz, hogy megvizsgáljuk annak a lehetőségét, hogy a bR fotonikai alkalmazása a leggyorsabb BR→I spektrális átmenetek között létrejöhet – 150 fs impulzusidejű gerjesztés

alatt 3 ps-os próba impulzus mérésével – kinetikai elemzést kell végeznünk. Az alkalmazott pumpa és próba impulzusok rövidek voltak, valamint az ismétlési frekvencia 1 Hz volt, így elegendő a gerjesztést követő első 4 ps-os időtartományt vizsgálnunk.

Ha megnézzük a bR fotociklusát, látható, hogy csak a H , I , J és K állapotok keveréke jelenik meg a gerjesztést követő 4 ps-on belül (ld. 2. ábra). Ezen intermedierek sebességi állandóit felhasználva az irodalomból [30, 146-148] meghatározható, hogy mennyi a relatív hozzájárulásuk a próba impulzus fényindukált intenzitásváltozásához. Az irodalomból rendelkezésünkre álló adatokból, valamint a kísérleti körülményekből kiszámolható a H , I , J és K állapotok időbeli fejlődése (kialakulása és bomlása) a próba impulzusunk időtartama alatt. Számos kísérleti és elméleti kutatást végeztek, hogy felfedjék a gerjesztést követő ultragyors intramolekuláris eseményeket [30, 149-152]. Összegezve mindezeket, a gerjesztést követő Franck-Condon állapot (H_{560}) után a bR vibrációs relaxált – kvázi-stacionárius – S_1 állapotba (I_{460}), ezt követően pedig elektron-átmenettel a J_{625} állapotba jut. Mindez 500 fs-nál rövidebb idő alatt végbemegy. Ezt követően egy másik vibrációs-relaxációs folyamat vezet a K_{610} állapothoz, amely már 13-cis izomerizált retinál kromofórt tartalmaz.

Méréseim során a fotociklust intenzív (3mJ/cm^2) és rövid (150 fs) pumpa impulzus indította be. A gerjesztést követően egy 3 ps-os próba impulzust használtam a szárított bR minta törésmutató-változásának nyomon követésére. A próba impulzus jelenlétekor mindegyik korai állapot egyidejűleg jelen van a mintában, így a mért jel mindegyik állapot hozzájárulását tartalmazza. A számolásom során az alábbi fotociklus modellt (beleértve az alapállapotot: BR állapot) használtam:

A BR abszorpciós hatáskeresztmetszete (σ) 530 nm-en $0.76 \cdot 10^{-16} \text{ cm}^2$. Az átmenetekhez tartozó elsőrendű sebességi állandókat a nyilak fölött találhatjuk az (5.3) folyamatábrán. A minta $I_{\text{pump}}(t)$ gerjesztését $\tau=150$ fs félértékszélességű Gauss-impulzussal modelleztem. Az intermedierek koncentrációinak időbeli fejlődését numerikus számolással megkaphatjuk, alkalmazva az alábbi elsőrendű sebességi differenciálegyenlet-rendszert:

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dt}[BR] &= -I_{\text{PUMP}}(t)\sigma[BR] + k_2[I] \\
\frac{d}{dt}[H] &= I_{\text{PUMP}}(t)\sigma[BR] - k_1[H] \\
\frac{d}{dt}[I] &= k_1[H] - (k_2 + k_3)[I] \\
\frac{d}{dt}[J] &= k_3[I] - k_4[J] \\
\frac{d}{dt}[K] &= k_4[J]
\end{aligned} \tag{5.4}$$

Itt $[X](t)$ az X állapot időfüggő koncentrációját jelöli (beleértve a BR alapállapotot is), és k_i az i -edik elsőrendű átmenetnek megfelelő sebességi állandó.

Az alábbi sebességi állandókat használtam a MATLAB beépített Newton-módszerével történő számolások során:

- ♦ Az $1/k_1$ az I -állapot megjelenése (30 fs) [149, 151].
- ♦ A k_2 és k_3 meghatározása az I -állapot lecsengéséből történt: $1/(k_2+k_3)=500$ fs [150, 152], továbbá k_3/k_2 számolása a fotociklus kvantumhatásfokának kísérleti meghatározásából történt (annak a valószínűsége, hogy egy gerjesztett állapotban (I) levő molekula J és onnan további-, vagy alapállapotba kerül). Száraz minta esetén ezt 63 %-nak találták [30], ezért $k_3/k_2=63/37$.
- ♦ A k_4 a K -intermedier felhalmozódásának időállandóját jelöli (3 ps) [148].

A kezdeti állapotokra vonatkozó nyilvánvaló feltétel, hogy $t=0$ időpillanatban a BR alapállapot relatív koncentrációja 1, minden más állapoté pedig zérus. A (5.4) differenciálegyenlet fenti értékekkel való megoldását a 47. ábra szemlélteti.

Mivel a BR és H állapotok között a spektrális eltolódás elhanyagolható, a jelentős spektrális eltolódás csak az I intermedier fejlődésénél kezdődik. Ezért elhanyagolható a H hozzájárulása a mért effektusunkhoz, és az egyszerűség kedvéért kihagytam a 47. ábrán.

A mért jelek értelmezése céljából az egyszerűség kedvéért először tételezzük fel, hogy ahhoz minden állapot a koncentrációjával arányos módon járul hozzá. Az egyes állapotoknak a próba impulzus által kiváltott optikai jelhez való súlyozatlan hozzájárulása a megfelelő állapot koncentrációja és a próba impulzus időbeli fejlődésének konvolúciójaként számítható ki. Minthogy a detektorunk válaszideje a tanulmányozott jelenségekhez képest lassú ($< 4^\circ\text{ps}$ illetve ~ 1 ns felfutási idő), a 46. ábrákon bemutatott detektált jelek nagysága a konvolúció során nyert függvény teljes időskálára számított határozott integráljával lesz arányos. Számításaink eredménye szerint ezen integrálok relatív értéke az I , J és K állapotokra

vonatkozólag 53%, 39% és 8%. A tényleges hozzájárulás számolása esetén az imént kapott értékeket súlyozni kell az egyes állapotok és a BR alapállapot törésmutatójának 790 nm-nél fennálló különbségével [34]. Figyelembe kell továbbá venni, hogy a BR₅₇₀ és az I₄₆₀ között nagyobb a spektrális eltolódás (ld. 3. ábra), ez a Kramers–Kronig-reláció szerint nagyobb abszolút törésmutató-változásnak felel meg, mint a J₆₂₅→BR₅₇₀ és a K₆₁₀→BR₅₇₀ állapotok közti eltolódások.

47. ábra – A bakteriorodopszin H, I, J és K állapotainak számolt időfejlődése

Összegezve tehát arra a következtetésre juthatunk, hogy a mért effektust több mint 53 %-ban az *I* állapot uralja, míg a *J* és *K* állapotok jóval kisebb hatással vannak a próba impulzusra (~39% illetve ~8%). Továbbá, az *I*, *J* és *K* állapotokra jellemző fő abszorpciós csúcsok spektrális eltolódásának nagyságát és irányát a BR állapothoz viszonyítva (110 nm kék; 55 nm vörös; 40 nm vörös) szintén a kék-eltolódás jellemző $t=0$ késleltetésnél, ami összhangban van a mért eredményeinkkel.

5.2.3. ÖSSZEFOGLALÁS

Integrált optikai hullámvezető felületére vékony bR film réteget helyeztem. Pumpa-próba mérésekkel kimutattam, hogy a bR abszorpciója miatt bekövetkező törésmutató-változás (azaz optikai pumpálás) hatására a hullámvezetőbe csatolt módus rezonancia csúcsa eltolódik a gerjesztést követően szubpikoszekundumos idő alatt. Mérési eredményeimet összevetettem

a bR fotociklusára vonatkozó időállandók értékeivel, amelyek alapján számolással igazoltam, hogy a mért jel intenzitásváltozását főként a $BR \rightarrow I$ átalakulással együtt járó törésmutató-változás dominálja.

A fenti eredmények mutatják, hogy a bR fotociklusának $BR \rightarrow I$ átmenete alkalmazható ultragyors, tisztán optikai elven működő fénykapcsolásra. Várhatóan hatékonyabb kapcsolást lehet elérni a jövőben a fehérje minta megfelelő módosításával (pl. a fotociklust meg lehet állítani J állapotban a kromofór kémiai módosításával), vagy hűtésével a K állapotban [149, 153]. Az itt bemutatott elv alapja lehet a jövőben egy fehérje alapú integrált optikai eszköz megvalósításának. Hasonló eszközök használatával a teljesen optikai elven működő kapcsolat forradalmasítható, a jelenlegi néhányszor 100 GHz a jövőben elérheti az 1 THz-es határt is.

2. tézispont: Integrált optikai hullámvezető felszínére szárított vékony bR réteget alkalmazva pumpa-próba mérésekkel kimutattam, hogy a bR abszorpciója miatt bekövetkező törésmutató-változás hatására a hullámvezetőbe csatolt vezetett módus rezonanciacsúcsa a gerjesztést követően szubpikoszekundumos idő alatt eltolódik. Mérési eredményeimet összevetettem a bR fotociklusára vonatkozó időállandók értékeivel, amelyek alapján számolással igazoltam, hogy a mért jel intenzitás-változását főként a $BR \rightarrow I$ átalakulással együtt járó törésmutató-változás dominálja. Az eredmények egyértelműen mutatják, hogy a bR fotociklusának $BR \rightarrow I$ átmenete alkalmazható ultragyors, tisztán optikai elven működő fénykapcsolásra.

5.3. A FAD FLUORESZCENCIA KINETIKÁJÁNAK VIZSGÁLATA KÜLÖNBÖZŐ MIKROKÖRNYEZETEK BEN

Az alábbi fejezetben bemutatom a FAD időbontott fluoreszcencia spektrumainak mérésének eredményét a víz, etanol, dioxán, DMSO és FCC környezetekben, majd részletezem a kinetikák analízisét, és összefoglalom eredményeimet.

5.3.1. A FAD FLUORESZCENCIÁJÁNAK MÉRÉSE KÜLÖNBÖZŐ MIKROKÖRNYEZETEK BEN

Az időbontott fluoreszcencia mérések előtt megmértem a $3 \cdot 10^{-3}$ M-os FAD törzsoldatok sztatikus (steady-state) abszorpcióját az 50mM-os, pH = 7.0-s foszfát pufferben. A mért abszorpciós spektrumot a 48. ábrán mutatom be.

48. ábra – A FAD törzsoldat abszorpciós spektruma 50 mM, pH = 7.0-s foszfát pufferben

Az idő és hullámhossz függvényében nyert jellegzetes kísérleti fluoreszcencia adatok a 49. ábrán láthatók. Ezek az adathalmazok igen komplex információt tartalmaznak az egyes komponensek kinetikai jellemzőiről, valamint a hozzájuk tartozó spektrumok időbeli változásairól. A könnyebb áttekinthetőség érdekében az adatokat 3D és színekódos ábrázolásban is bemutatom néhány esetben. A sötétvörös a legnagyobb, a sötétkék a legkisebb fluoreszcencia intenzitásnak felel meg.

49. ábra – A FAD fluoreszcenciája 50 mM Foszfát pufferben pH=7.0

Vizes oldatban semleges pH mellett (49. ábra) a 100 fs-os időtartományba eső növekedési szakaszban a spektrumok erős kék eltolódása a csörp következménye. A lecsengési szakasz többfázisú, és nagyrészt a 100 ps-os tartományon belül bekövetkezik. Ez összhangban van azzal a megfigyeléssel, hogy vizes fázisban a molekulák döntő többsége összehajtott konformációban van [65, 154, 155].

50. ábra – A FAD fluoreszcenciája 50 mM Foszfát pufferben pH=6.0

Ez a kép alig változik, ha a pH értéket egy egységgel csökkentjük (50. ábra) vagy növeljük (51. ábra). Ez összhangban van azzal, hogy extrém kis és nagy pH értékek kivételével vizes közegben a FAD molekula stabil [156], valamint Islam és mtsi. megállapításával, mely szerint a fluoreszcencia kinetika vizes oldatban az 5–9 pH tartományban nem változik [58].

51. ábra – A FAD fluoreszcenciája 50 mM Foszfát pufferben pH=8.0

Ismeretes, hogy etanol hozzáadásával az összehajtott konformációban lévő molekula szerkezete kinyílik, és ennek megfelelően a fluoreszcencia élettido megnövekszik [65]. Ez a jelenség jól látható az 52. ábrán.

52. ábra – A FAD fluoreszcenciája etanol-víz 1:1 arányú keverékében pH=7.0

NMR mérések során bebizonyították, hogy a nyílt konformáció létrejöttét dioxán hozzáadása is elősegíti. Emellett azt is megállapították, hogy a dioxán H-hidat képez az izoalloxazin gyűrűvel [157]. A dioxánnak a fluoreszcencia kinetikára gyakorolt hatását ez idáig nem tanulmányozták. Az 53. ábrán megfigyelhető, hogy az alkoholhoz képest a dioxán hozzáadása további jelentős élettido növekedést eredményezett, továbbá a spektrumok is kiszélesedtek. (Az ábrán a spektrum kék oldalát 500 nm alatt nem tudtam kiértékelni, mert a víz 3400 cm^{-1} közelébe eső intenzív kettős Raman vonalától származó 463 nm-nél megjelenő csúcs torzítja a fluoreszcencia spektrumot.)

53. ábra – A FAD fluoreszcenciája dioxán-víz 1:1 arányú keverékében pH=7.0

Femtosekundumos IR tranziens abszorpciós vizsgálatok alapján megállapították, hogy a nyílt konformációt a víznél lényegesen kevésbé poláros dimetil sulfoxid (DMSO) hozzáadása is generálja [154]. Fluoreszcencia kinetikai méréseket eddig ezen a rendszeren sem végeztek. Az 54. ábrán feltüntetett adatokból látható, hogy DMSO jelenlétében a fluoreszcencia a vizes és alkoholos mintákhoz képest kék eltolódást mutat, továbbá a spektrumok strukturáltabbak. A fluoreszcencia élettideje jelentősen hosszabb a vizes mintakénál, de rövidebb, mint alkohol vagy dioxán esetén.

54. ábra – A FAD fluoreszcenciája DMSO-víz 1:1 arányú keverékében pH=7.0

A különböző vizes oldatok mérései után az FCC fehérjéhez kötött FAD-ot tanulmányoztam, amely esetünkben a *Thiocapsa roseopersicina* baktériumból lett izolálva. A fehérje szerkezetét az 55. a ábrán mutatom be. A folyadék fázisban oldott FAD molekulákkal ellentétben az FCC-n végrehajtott Röntgen-diffrakciós vizsgálatok eredményeképpen a hozzá

kötődő FAD molekula pontos konformációs állapota is ismert (55. b ábra). Jól látható, hogy fehérjéhez kötött állapot esetén a FAD alapvetően nyitott konformációs szerkezetet mutat.

55. ábra – Az FCC fehérje szerkezete (a) külön kiemelve a hozzá kötődő FAD molekula konformációját (b) [158]

Az időbontott méréseim előtt szintén megmértem a törzsoldat abszorpciós spektrumát, amely az 56. ábrán látható. A nem kötött FAD – mint azt a 48. ábrán is láthattuk – a 400 nm körüli hullámhossz-tartományban kicsit más abszorpciós spektrummal jellemezhető.

56. ábra – A flavocitokrómhoz kötött FAD abszorpciós spektruma

Mínt hogy FCC esetén közel sem érhető el akkora kromofór koncentráció, mint oldatban, a fehérjéből származó időbontott fluoreszcencia jelek ebben az esetben lényegesen kisebbek voltak. A lényegesen megnövekedett mérési idők következtében FCC-n széles hullámhossz tartományban csak a TCSPC módszerrel készültek mérések, a felkonvertálós módszerrel

egyelőre csak néhány kiválasztott hullámhosszon. A TCSPC mérések eredményeit az 57. ábrán mutatom be. A különböző oldatokban mért FAD fluoreszcenciájához képest szembetűnő a különbség, hogy az 530 nm-s csúcson kívül megjelenik egy annál intenzívebb csúcson is ~465 nm-es maximummal. Ezen kívül a fluoreszcencia lecsengése is sokkal gyorsabb.

57. ábra – A flavocitokróomhoz kötött FAD fluoreszcenciája

5.3.2. ANALÍZIS ÉS EREDMÉNYEK

Az imént bemutatott, különböző mikrokörnyezetekben mért FAD idő- és hullámhosszbontott fluoreszcenciáját a BPDN optimalizációs eljárás alapján multiexponenciális illesztéssel analizáltam. Szemben a gyakran alkalmazott globális analízissel, a különböző hullámhosszakon mért fluoreszcencia kinetikák egymástól függetlenül lettek kiértékelve. Az adatok jel/zaj viszonya magasabb volt a TCSPC módszerrel mért szakaszban, amely méginkább nőtt a logaritmikus tömörítés során. A fluoreszcencia intenzitásának a teljes adatsorra vonatkozó maximális értékére normalizált zajszint jellegzetes standard deviációja $\delta = 5 \times 10^{-3}$ körüli érték volt. Ennek megfelelően a regularizációs paramétert $\lambda = 3 \times 10^{-4}$ értéknek állítottam be, amely az előzetes szimulációink során tapasztaltak szerint ehhez a zajszinthez optimálisnak bizonyult. [129]. Az analízis eredményét a FAD vizes oldatán (pH = 8.0) az 580 nm-en mért fluoreszcencia kinetika esetében az 58. ábrán mutatom be. A felső ábra (58.a) a BPDN analízis során kapott időállandó-eloszlást mutatja ($t_0 = 496$ fs; $\text{IRF}_{\text{fwhm}} = 262$ fs; $\delta = 2.38 \times 10^{-3}$). Látni, hogy az időállandók eloszlása ritka (*sparse*), néhány nagyon élesen meghatározott nemzérus értékből áll. A középső ábrán (58.b) a mért (kék görbe) és az analízis eredményéből visszaszámolt, (piros pont) egyre normált kinetika látható. Az alsó ábrán (58.c) pedig a mért és számolt kinetikák közti eltérést mutatom be. Az eltérés ± 0.005 értéken belül

van, ami nagyon jónak mondható, és semmilyen struktúrát nem mutat. (A 250 ps-nál jól elkülönül a két mérés technikára jellemző zajszint.)

58. ábra – A FAD fluoreszcencia lecsengése vízben 580 nm-en (pH=8.0) **a)** A BPDN alanízis során kapott időállandók a hozzájuk tartozó amplitudók függvényében; **b)** A mért (kék) és visszszámolt (piros) kinetika 580 nm-en; **c)** Az illesztés eltérése.

A mért és az illesztések során visszkapott FAD fluoreszcencia kinetikák nagyon jó egyezést mutatnak a teljes spektrális tartományon (59. ábra).

59. ábra – A FAD idő- és spektrálisan bontott fluoreszcenciája vízben (pH=8.0) (kék: mért fluoreszcencia; piros: a BPDN analízis eredményeképpen rekonstruált fluoreszcencia, $\lambda = 3 \times 10^{-4}$)

Az illesztés során nyert időállandók és amplitudók hullámhossz szerinti eloszlását a 60. ábrán foglaltam össze. A 2D ábrán zöld színnel jelölöm a nulla, pirossal a pozitív, kékkel pedig a negatív amplitudó-értékeket. Figyelemre méltó, hogy az időállandók eloszlása nagyon „ritka” és a teljes hullámhossz-tartományon át az amplitudók nagyon szűk eloszlást mutatnak, annak ellenére, hogy az illesztések hullámhossz-függetlenül történtek. Alacsony hullámhosszon ugyan megfigyelhető kisebb hullámváz, elmosódás az időállandókban, azonban nagy valószínűséggel ezt a mérések rosszabb jel/zaj viszonya okozza. Ez a 2D amplitudó-eloszlás egyértelműen jelzi, hogy a kinetika valóban diszkrét, különben az időállandók hullámhossz menti eloszlása diffúzabb és kevésbé szeparált lenne.

60. ábra – A kapott amplitudók eloszlása a hullámhossz és az időállandók terében (az 54. ábra mérésének BPDN analiziséből)

Mint az 58. és 60. ábrák mutatják, a kinetikák minden egyes hullámhosszon jól jellemezhetők öt időállandóval, melyek átlagos értéke: 500 fs, 2 ps, 10 ps, 80 ps és 3 ns. Ha részletesebben szeretnénk tanulmányozni az eredményeinket, akkor a kapott időállandók és amplitudók spektrumait célszerűbb külön-külön szemügyre venni. A 61. a ábrán (felül) az időállandók hullámhosszfüggését szemléltetem. A vonalak pontjai egy adott hullámhosszon (mint pl. az 58. a ábra, 580 nm-en) az időállandók statisztikai súlyozott átlagából lettek kiszámolva – az egyes csúcsokhoz tartozó amplitudók (jellegzetesen 2-3 érték), mint súlyozási faktorok alkalmazásával. Az amplitudók összegének hullámhosszfüggését pedig a 61. b ábra mutatja. Ez az ábra maga az amplitudó spektrum, a DAS, amelyet az irodalomban gyakran használnak a hagyományos kinetikai elemzések során [159, 160].

61. ábra – A BPDN analízis során kapott időállandók és amplitúdók spektrumai

A 61. összefoglaló ábrát úgy is értelmezhetjük, hogy a kinetikai elemzések során tehát öt független komponenssel lehet pontosan leírni a FAD fluoreszcencia kinetikáját vízben. Alaposabban tanulmányozva az amplitúdó spektrumokat látható, hogy a leggyorsabb komponens (~500 fs, piros vonal) amplitúdója speciális hullámhossz-függést mutat: alacsony hullámhosszokon pozitív, míg 560 nm felett negatív értékű. A DAS esetén egy ilyen tipikus szerkezet arra utal, hogy a mögöttes folyamat kapcsolatban lehet a fluoreszcens kromofórok körüli vízmolekulák solvatációs dinamikájával [161]. Ez az értelmezés jó egyezést mutat a komponens ~500 fs-os élettartamával. Az irodalom alapján a solvatációs válaszidő 800 fs körüli, amely a diffúz mozgást jellemzi vízben [162]. A ~800 fs-os élettartam és az alacsonyabb hullámhosszak felé eltolódott spektrum is a solvatációs dinamikának tulajdonítható egy korábbi tanulmány alapján [55].

A többi négy (2 ps, 10 ps, 80 ps és 3 ns) komponens amplitúdó spektruma igen hasonló egymáshoz és a FAD publikált fluoreszcencia spektrumához [56]. Az irodalomban általános az egyetértés, hogy a ns körüli élettartammal rendelkező komponens a FAD nyitott, a pikoszekundumos időtartományba eső komponensek pedig az összehajtott konformációra jellemzőek, ahol a közelbe kerülő ADP csoport kioltja a flavin fluoreszcenciáját [55, 56, 163].

Bár az egyes publikációkban fellelhetőek az általunk megfigyelt időállandókhoz hasonló értékek, ezek általában egy-egy szűk időablakban végrehajtott mérések eredményei. Az általunk elsőként alkalmazott széles idő- és spektrális tartományban végrehajtott, és a BPDN-módszerrel analizált kísérletek egyértelműen jelzik, hogy a FAD molekulák konformációs állapota heterogénebb, mint azt korábban gondolták. Az eddig csupán 'összehajtott konformáció'-nak nevezett állapot valójában három különböző populációból áll [163].

A továbbiakban összefoglalom az iménti analízis során kapott eredményeinket különböző mikrokörnyezetek esetén. A FAD emissziós maximumánál (530 nm) megnézve a kinetikákat a különböző környezetekben (víz, etanol, dioxán, DMSO, FCC) szembetűnő különbségeket kapunk (62. ábra). Mint várható volt, a vízben a fluoreszcencia kioltás gyorsabb, mint a többi szerves oldószerek jelenlétében [55, 163]. Az általunk először vizsgált flavocitokrómhoz kötött FAD fluoreszcenciája esetében a kioltása rövidebb időskálán bekövetkezik, mint minden más mikrokörnyezetben.

62. ábra – A FAD kinetikája különböző mikrokörnyezetekben 530 nm-en

A 62. ábrán feltüntetett kinetikákhoz tartozó BPDN analízisek eredményeit a 63. ábrán mutatom be (a femtoszekundumos komponenst nem tüntettem fel). Látható, hogy a különböző oldószerekhez tartozó időállandók pozíciójában fellelhető valamelyes eltolódás, amely az oldószereknek a fluoreszcenciára való direkt kölcsönhatásával magyarázható. A lényeges különbségek azonban elsősorban az amplitúdókban figyelhetők meg, ami az egyes konformációk populációjáról szolgáltat információt. Mint várható volt, dioxán, etanol és

DMSO jelenléte esetén a lassabb, nyitott konformációjú komponensek dominálnak, víz és FCC esetében pedig a gyorsabbak vannak túlsúlyban. Érdekes eredmény, hogy FCC esetében a kinetika egyáltalán nem tartalmaz 1–10 ns-os komponenst. Ez annál inkább meglepő, mivel az 55. b ábra tanúsága szerint az FCC-hez kötött FAD molekula alapvetően nyitott konformációjú. Feltehető tehát, hogy a gyors komponenseket eredményező intenzív kioltás valamely aminosav oldalláncok által okozott direkt perturbáció eredménye. Ez a jövőben lehetőséget nyújt a különböző környezeti hatásoknak kitett fehérjében lejátszódó finom szerkezeti változások követésére.

63. ábra – A FAD 530 nm-en mért fluoreszcencia kinetikájának időállandó eloszlása különböző mikrokörnyezetekben

5.3.3. ÖSSZEFOGLALÁS

Részt vettem egy femtoszekundumos időfelbontású komplex fluoreszcencia kinetikai mérőrendszer megépítésében és kalibrálásában. Megmértem a FAD fluoreszcencia kinetikáját széles idő- és spektrális tartományon vízben, víz-dioxán, víz-etanol, víz-DMSO oldatokban, valamint fehérjéhez (*flavocitokrómhoz*) kötve, amely segít megérteni a koenzim intra- és extramolekuláris kölcsönhatásait. Méréseimet egy-foton számláló, illetve a szubpikoszekundumos időtartományon frekvencia átalakítási technikákon alapuló módszerekkel végeztem. A kétféle elrendezés teljes spektrális és időablakbeli összefésülése után egy új kiértékelési algoritmust (*Basis Pursuit Denoising*) először alkalmazva meghatároztam a FAD időállandóit különböző mikrokörnyezetekben. Megállapítottam, hogy

oldatok esetében a FAD fluoreszcencia lecsengés négy komponenssel jellemezhető, amelyek egy nyitott és három különböző zárt konformációnak tulajdonítható. Jellemeztem az egyes konformációk populációját a különböző oldószerekben. Ezeken túl vízben a solvatációs dinamikára utaló 500 fs-os időállandót is sikerült kimutatnom. Az általam elsőként tanulmányozott FCC fluoreszcencia kinetika minden más környezetnél nagyobb mértékű kioltást mutatott, ami a kromofórnak az aminosav oldalláncokkal való erős kölcsönhatására utal. A széles idő- és spektrális tartományban végzett és új, igen hatékony módszerrel kiértékelt kísérletek a FAD fluoreszcencia mechanizmusának minden eddigénél komplexebb leírását eredményezték [129].

3. tézispont: Részt vettem egy femtoszekundumos időfelbontású komplex fluoreszcencia kinetikai mérőrendszer megépítésében és kalibrálásában. Megmértem a FAD fluoreszcencia kinetikáját széles idő- és spektrális tartományon vízben, víz-dioxán, víz-etanol, víz-DMSO oldatokban, valamint *flavocitokrómhoz* kötve, amely segít megérteni a koenzim intra- és extramolekuláris kölcsönhatásait. Egy új kiértékelési algoritmust (*Basis Pursuit Denoising*) először alkalmazva megállapítottam, hogy oldatok esetében a FAD fluoreszcencia lecsengése négy komponenssel jellemezhető, amelyek egy nyitott és három különböző zárt konformációnak tulajdoníthatók. Ezeken túl vízben a solvatációs dinamikára utaló 500 fs-os időállandót is sikerült kimutatnom. Az általam elsőként tanulmányozott flavocitokróm C fluoreszcencia kinetika minden más környezetnél nagyobb mértékű kioltást mutatott, ami a kromofórnak az aminosav oldalláncokkal való erős kölcsönhatására utal. A széles idő- és spektrális tartományban végzett és új, igen hatékony módszerrel kiértékelt kísérletek a FAD fluoreszcencia mechanizmusának minden eddigénél komplexebb leírását eredményezték.

5.4. A NADH ABSZORPCIÓ KINETIKÁJÁNAK MÉRÉSE NYITOTT ÉS ZÁRT KONFORMÁCIÓBAN

Az alábbi fejezetben bemutatom a NADH statikus abszorpciós és fluoreszcencia spektrum mérésének eredményét, majd részletezem a tranziens abszorpciós mérések eredményét különböző koncentrációjú metanol környezetekben. Végül bemutatom a kinetikák illesztésének eredményeit és összegzem munkám.

5.4.1. STATIKUS ABSZORPCIÓ ÉS FLUORESZCENCIA MÉRÉSEK

Az abszorpciókinetikai mérések előtt és után minden esetben mértem abszorpciós spektrumokat, ellenőrizve ezzel a minta stabilitását. A 64. ábrán látható, hogy a mérés előtti (fekete görbe) és utáni kontroll (piros) görbe teljesen megegyezik, a pumpa-próba mérésnél használt minta pedig csak nagyon kis mértékben tér el (zöld), ami az irodalom alapján még elfogadható [60]. A különbséget a pumpáló UV fény által okozott direkt fotodegradáció vagy az abszorpció folytán fellépő magasabb hőmérsékleten bekövetkező bomlás okozhatta.

64. ábra – A NADH abszorpciós spektruma

A fluoreszcencia spektrumokat egy standard fluoriméterrel mértem meg különböző (0, 25, 50, 70 és 80 %) metanol-koncentráció értékeknél 266 nm hullámhosszú gerjesztést alkalmazva (65. ábra). Látható, hogy a növekvő metanol-koncentráció mellett a fluoreszcencia intenzitása egyre csökken. Ez várható volt, hiszen a NADH metanolban nyitott konformációban van, tehát az adenin csoport térben eltávolodik a fluoreszkáló nikotinamid csoporttól (2.1.2.2.

alfejezet, 7. ábra), vagyis az energia transzfer esélye lecsökken a két csoport között. A 65. ábrán 532 nm-nél a keskeny, intenzív csúcs a spektrumban csak melléktermék, a gerjesztő fény második rendbeli diffrakcióját nem lehetett a gyári szűrőkkel eliminálni.

65. ábra – A NADH steady-state fluoreszcenciája 266 nm gerjesztés mellett

A fluoreszcencia MeOH-függését még jobban szemlélteti a 66. ábra, amely esetén a fluoreszcencia gerjesztési spektrumokat is bemutatom, 470 nm megfigyelési hullámhossz mellett az imént megadott metanol koncentrációk függvényében.

66. ábra – A NADH fluoreszcencia gerjesztési spektruma 470 nm-en különböző metanol-koncentrációk esetén

Az így kapott abszorpciós maximumok intenzitásának arányából kiszámolható a két konformációs állapot közötti *energia transzfer képessége* (RPET, *relative probability for energy transfer*)[59]:

$$RPET = \frac{I_N - I}{I_N - I_D}, \quad (5.5)$$

ahol I a fluoreszcencia intenzitás, I_N a natív (zárt forma), I_D pedig a denaturált (nyitott forma) NADH fluoreszcencia gerjesztési intenzitása. Mint ahogy a 67. ábrán látható, 50 % metanol koncentráció alatt még képes energia átadásra az adenin csoport, 80 % esetén azonban már egyáltalán nem. Ezeket az előismereteket felhasználva a NADH tranziens abszorbciónál 0, 50, 70 és 80 % metanol koncentrációkon érdemes mérni, hogy jól lássuk a konformációk közti különbségeket.

67. ábra – A NADH energiáttranszfer képessége különböző metanol koncentrációknál

5.4.2. TRANZIENS ABSZORPCIÓS MÉRÉSEK

Pumpa-próba méréseim során először a NADH minták abszorpció változását mértem meg adott metanol koncentráción, majd ezt követően az azonos metanol koncentrációjú PIPES puffert. Az abszorpciós spektrumokat mind a NADH minták, mind pedig a pufferek esetében a -300 fs és 4,5 ns közötti késleltetés tartományon belül négy különböző metanol koncentráción, egyenként 40-szer mértem meg, majd ezeket átlagoltam. Összesen 135 késleltetésnél vettem fel a tranziens spektrumokat, az 1 ps alatti időtartományban lineáris, míg az 1 ps feletti tartományban logaritmikus lépésközzel haladtam. A 68. ábrán a szaggatott, kék

vonala egy mérés eredményét mutatja metanol jelenléte nélküli NADH mintánál, míg a folytonos, piros görbe a 40 mérés átlagát szemlélteti. (A kék görbén 10^5 fs értéknél fellépő egy pontból álló csúcs a mintában fellépő buborékképződés eredménye. Az ilyen típusú hibákat az átlagolás előtt elimináltam.)

68. ábra – Metanol jelenléte nélkül a NADH 370 nm-nél mért abszorpcióváltozása a késleltetés függvényében (kék, szaggatott vonal: egy mérés; piros, folytonos vonal: 40 mérés átlaga)

Mivel előfordult esetenként a minta buborékolása (például 68. ábra, 10^5 fs értéknél, kék görbe), ami hirtelen, 1 pixelnyi kiugrást jelentett az adatsorokban, ezért az átlagolások előtt egyesével végignéztam a méréseket. Ahol 1 pixelnyi hirtelen abszorpcióváltozást találtam, ott az előző vagy következő buborékmentes mérés megfelelő pixelértékével kicseréltem a „hibás” pixelhez tartozó értéket. Majd e buborékkorekció elvégzése után hajtottam végre a mérések átlagolását.

A puffer és a minta kinetikáit a 69. ábrán mutatom be 390 nm-nél. Jól látható, hogy az UV impulzusok nem károsították sem a puffert, sem pedig a NADH mintákat. A 40 mérés ideje nagyjából négy óra volt, amely során nem tapasztalható időfüggő komponens.

69. ábra – (a) A PIPES puffer és a (b) NADH minta kinetikája 390 nm-nél. Kékkel az 1. mérés, pirossal a 10. mérés, zölddel pedig a 40. mérés eredménye látható.

Az adatok kiértékelését Scilab és Matlab programokkal végeztem a *Kísérleti anyagok és módszerek* című fejezetben leírtak alapján. A felvett spektrumok már spektrálisan kalibrálva voltak a beolvasáskor. Így először a csörpkorrekciót hajtottam végre. Mivel a vizsgált NADH mintát különböző metanol koncentrációjú pufferben mértem, így minden egyes mintánál megmértem a hozzá tartozó oldószert is.

E korrekció után az abszorpció változás nulla szintjének keresése, vagyis a háttér korrekciója következett. Itt a negatív ($t=0$ előtti) időtartománybeli késleltetéseknél a mérésekből egy átlagos háttérrel számoltam, amit nulla abszorpció-változásnak definiáltam, majd minden egyes képen végrehajtottam ezt a háttérkorrekciót. Vagyis ezen két korrekcióval mind a méréseim időtengelyét, mind pedig az abszorpciós tengelyét megfelelően kalibráltam.

A 4.4.3 fejezetben leírt módon feldolgozott (csörp- és háttérkorrekció, valamint zajszűrés) abszorpciókinetikákat a 70. ábra mutatja (vö. a 36. ábrán látható korrigálatlan adatokkal).

70. ábra – A PIPES puffer időbontott TPA spektruma 80 % metanol jelenléte esetén csörp- és háttérkorrekciót, valamint zajszűrést követően

A kiértékeléseim utolsó lépése az oldószer-korrekció volt. A (4.15) illesztést és kivonást elvégezve, az oldószerkorrekció utáni időbontott spektrumokat a 71. ábrán mutatom be 0, 50, 70 és 80 % metanol koncentrációknál.

71. ábra – A NADH időbontott spektrumai (a) 0, (b) 50, (c) 70 és (d) 80 % metanol koncentrációk esetén

A szinkódolás a 71. *a–d* ábrákon megegyezik: a piros a pozitív, sötétkék a negatív abszorpció-változásnak felel meg. A metanos (a) és metanolmentes (d) esetben szembetűnő a különbség: a 470-550 nm közötti SE, valamint a 370 nm központi hullámhosszon látható ESA 80% metanol koncentráción már teljesen eltűnik. Ezeket az eltéréseket a tranziensekben a jobb átláthatóság miatt a 370 nm (72. ábra) és 520 nm (73. ábra) hullámhosszakon külön-külön is bemutatom különböző MeOH koncentrációk mellett. Külön ábrázoltam az első 1 ps-os időablakot lineáris skálán, és logaritmikus skálán az 1 ps utáni tartományt.

72. ábra – A NADH időfüggő abszorpció változása 370 nm-en

73. ábra – A NADH időfüggő abszorpció változása 520 nm-en

Az adenin csoport gerjesztését követő abszorpció-változás spektrumának időfejlődése látható a 74. ábrán, metanol jelenlétében (a) illetve hiányában (b). Mindkét esetben abszorpció-

növekedés tapasztalható a 350–450 nm-es tartományban. Ez a gerjesztett állapotbeli abszorpció a nikotinamid csoport abszorpciós sávjába esik, és meghaladja a megfelelő alapállapotú kifakulást. Amint lentebb látható, ez a sáv mind az adenin, mind a nikotinamid ESA-jából adódik, a korábban kialakuló, adeninhez kapcsolható spektrum (0 % metanol) abszorpció-változása valamivel nagyobb. További, az adenintől származó ESA figyelhető meg az 500 nm feletti tartományban, amely igen gyorsan (<2 ps) csökken, bár tiszta vízben valamivel nagyobb időállandóval (~10 ps).

74. ábra – A NADH abszorpciós differenciaspektrumának időbeli fejlődése 0 % **(a)** és 80 % **(b)** metanol esetében

Ennek a vörösbeli ESA-lecsengésnek a velejárója egy, a 450-570 nm-es tartományon megjelenő negatív abszorpció, ami tiszta vízben figyelhető meg legjobban. E negatív sáv maximuma egybe esik a NADH emissziós maximumával, ezért ezt indukált emisszióknak tulajdoníthatjuk. A gerjesztés után 200 fs-mal mért spektrumok mindegyik metanol-koncentráció esetén hasonlóak, de a metanol nélküli mintában a 2 és 100 ps közti spektrumok esetén, főleg az előbb említett negatív abszorpciós tartományban figyelhető meg eltérés. Ez alátámasztja a nyitott konformációs (>80 % MeOH koncentráció feletti) állapotbeli fluoreszcencia-kilöttást.

5.4.3. A KINETIKÁK ILLESZTÉSE ÉS ÉRTELMEZÉSE

A 380 és 520 nm-en mért kinetikák (75. ábra) jelentősen különböznek a két esetben: 80% metanolban néhány ps alatt lecsengenek, míg vízben egy második, növekvő fázist találunk a 10 ps-os időtartományban. Ez a különbség a spektrumok időfejlődésén is jól látható (ld. 72–74. ábrákon).

75. ábra – A NADH transiens abszorpciójának időfejlődése 0 % (a) és 80 % (b) metanol esetében

Azt találtam, hogy a kinetikák hullámhossztól és metanol-koncentrációtól függetlenül három exponenciálissal illeszthetők. A leggyorsabb, 250 fs-os időállandójú komponens metanol jelenlététől függetlenül minden esetben jelentkezik. Ez az adenin csoport gerjesztett állapotú abszorpciójának tulajdonítható és az adeninhez kapcsolható vörös ESA lecsengését jellemzi a $\lambda > 600$ nm-es tartományban. Metanol nélkül további két komponens (3, ill. 350 ps időállandóval) jelentkezik relatíve nagy súllyal, mind a 380, mind az 520 nm-es kinetikák esetén. A kb. 3 ps-os komponens szintén megfigyelhető a vörös ESA lecsengésében. Ezek alapján megállapíthatjuk, hogy vízben az adenintől a nikotinamid felé energia-átadás történik, amelyet a nikotinamid fluoreszcens gerjesztett állapotának lecsengése követ 350 ps-on belül. Metanol jelenlétében a gyengébb hatásfokú energia-átadásnak megfelelően a nikotinamidhoz kapcsolható, gyenge ESA és stimulált emisszió jelentkezik 3 ps-os időállandóval. Mindezt a 6. táblázatban összegzem.

Koefficiens	0 % MeOH ESA: A & NA	0 % MeOH ESA: A	80 % MeOH ESA: A & NA	80 % MeOH ESA: A
$A1 \cdot 10^4$	10.4 ± 1.2	6.12 ± 1.2	7.04 ± 1.9	7.83 ± 1.7
τ_1 [fs]	270 ± 30	270 ± 30	270 ± 40	270 ± 40
$A2 \cdot 10^5$	28.8 ± 3.1	27.4 ± 3.1	0.2 ± 1.1	-1.2 ± 1.1
τ_2 [ps]	5.2 ± 0.12	5.2 ± 0.12	5.2 ± 0.15	5.2 ± 0.14
$A3 \cdot 10^5$	-36.5 ± 2.3	-	0.3 ± 1.6	-
τ_3 [ns]	0.3 ± 0.01	-	0.3 ± 0.02	-

6. táblázat – A NADH nyitott és zárt konformációs állapotának időállandói és amplitúdói, valamint a két konformációs állapot lehetséges működési mechanizmusa
(A: Adenin csoport; NA: nikotinamid csoport)

Összefoglalásként megállapíthatjuk, hogy az adenin gerjesztett állapotának lecsengése kétfázisú folyamat, és csak a lassabb, 3 ps-os időállandóval jellemezhető folyamat felelős a nikotinamid gyűrű gerjesztéséért. Ez csak abban az esetben lehetséges, ha tiszta vízben legalább két konformációs állapot (nyitott, ill. zárt) együtt van jelen. Metanol hozzáadásával ez a termodinamikai egyensúly a nyitott konformáció felé tolódik el, amely a FRET gyengülését eredményezi a két csoport térbeli távolodása miatt.

5.4.4. ÖSSZEFOGLALÁS

Femtoszekundumos pumpa-próba módszerrel megmértem a NADH tranziens abszorpcióját 0, 50, 70 és 80 % metanol koncentrációkon. A mért adatok globális analízisét használva meghatároztam a különböző metanol koncentrációkhoz tartozó időrátaakat, ezáltal a molekula szerkezeti változására (nyitott és zárt konformáció) vonatkozó 250 fs, 3 ps és 0.35 ns időállandókat sikerült megadnom. Ezek ismeretében a molekula működését az alábbiakban foglalom össze. Az általam mért leggyorsabb időállandó ~250 fs – ami megjelenik a metanol jelenlétében és hiányában egyaránt – az adenin csoport gerjesztett állapotú abszorpciójának (ESA, excited state absorption) tulajdonítható. A második és a harmadik komponens (3 ps és

350 ps) 380 és 520 nm-en a metanol-mentes minta esetében egyre nagyobb hangsúlyt, azaz amplitúdó értéket kap. Ezek a megfigyelések azt mutatják, hogy vízben az energiaátadás az adenintől a nikotinamidhoz 3 ps időállandóval jellemezhető, majd a nikotinamid csoport gerjesztett állapotból indukált emisszióval (SE, stimulated emission) 350 ps alatt tér vissza alapállapotba. Metanol jelenlétében, a nikotinamid csoporthoz tartozó ESA és SE időállandója sokkal alacsonyabb amplitudójú (közel nulla), ami összhangban van a várt energia-átadás csökkenésével nyitott konformációban, hisz a két csoport térben eltávolodik egymástól.

4. tézispont: Femtoszekundumos pumpa-próba módszerrel megmértem a NADH tranziens abszorpcióját 0, 50, 70 és 80 % metanol koncentrációkon, ami a molekula különböző konformációs állapotairól ad információt. A mért adatok globális analízise eredményeként az abszorpció kinetikák 250 fs, 3 ps és 350 ps időállandókkal voltak jellemezhetőek. A 250 fs-os időállandó az adenin csoport gerjesztett állapotú abszorpciójának tulajdonítható. A második és a harmadik komponens metanol-mentes minta esetében rendelkezik nagy amplitúdó értékkel. Ezek a megfigyelések azt mutatják, hogy vízben az energiaátadás az adenintől a nikotinamidhoz 3 ps időállandóval jellemezhető, majd a nikotinamid csoport a gerjesztett állapotból 350 ps alatt tér vissza alapállapotba. Növekvő metanol koncentrációval az energiaátadást biztosító zárt konformáció populációja egyre csökken, ami a fenti lassú komponensek súlyának csökkenéséhez vezet.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

6.1. MAGYAR NYELVŰ TÉZISSZERŰ ÖSSZEFOGLALÓ

Munkám során ultrarövid, nJ–mJ energiájú lézerimpulzusok spektroszkópai alkalmazásával foglalkoztam. Eredményeim két fő kutatási irányvonalat céloztak meg. Az egyik a *bakteriorodopszin* membránfehérje törésmutatójának vizsgálata és lehetséges alkalmazása az optikai távközlésben. A másik irányzat pedig a *flavin adenin dinukleotid* és a redukált *nikotinamid adenin dinukleotid* koenzimek ultragyors időbontott spektroszkópai vizsgálata, mivel e koenzimek a sejtek energiatermelő folyamataiban (energiatranszport láncban) vesznek részt, így vizsgálatukon keresztül többek között a sejtek metabolikus állapota is tanulmányozható. Tudományos eredményeimet az alábbi tézispontokban foglalom össze:

1. A minimális deviáció szögének méréséből meghatároztam a törésmutató értékeket, ahol a levegő diszperzióját az aktuális laboratóriumi állapotra nagy pontossággal kiszámoltam a hőmérséklet- és nyomásfüggő Sellmeier-egyenletből. Először meghatároztam a TRIS puffer törésmutatóját, majd a bR szuszpenziók törésmutatóját különböző koncentrációkon 390-880 nm közti hullámhossztartományon. Elsőként adtam meg a TRIS puffer és a bR szuszpenzió Sellmeier-együtthatóit [J1, C1-C4, K1-K3].
2. Integrált optikai hullámvezető felszínére szárított vékony bR réteget alkalmazva pumpa-próba mérésekkel kimutattam, hogy a bR abszorpciója miatt bekövetkező törésmutató-változás hatására a hullámvezetőbe csatolt vezetett módus rezonanciacsúcsa a gerjesztést követően szubpikoszekundumos idő alatt eltolódik. Mérési eredményeimet összevettem a bR fotociklusára vonatkozó időállandók értékeivel, amelyek alapján számolással igazoltam, hogy a mért jel intenzitás-változását főként a BR→I átalakulással együtt járó törésmutató-változás dominálja. Az eredmények tisztán mutatják, hogy a bR fotociklusának BR→I átmenete alkalmazható ultragyors, tisztán optikai elven működő fénykapcsolásra [J2, C5-C9, C11-C16, C20, K4, K5].
3. Részt vettem egy femtoszekundumos időfelbontású komplex fluoreszcencia kinetikai mérőrendszer megépítésében és kalibrálásában. Megmértem a FAD fluoreszcencia kinetikáját széles idő- és spektrális tartományon vízben, víz-dioxán, víz-etanol, víz-DMSO oldatokban, valamint *flavocitokróm*hoz kötve, amely segít megérteni a koenzim intra- és extramolekuláris kölcsönhatásait. Egy új kiértékelési algoritmust (*Basis Pursuit Denoising*)

először alkalmazva megállapítottam, hogy oldatok esetében a FAD fluoreszcencia lecsengése négy komponenssel jellemezhető, amelyek egy nyitott és három különböző zárt konformációnak tulajdoníthatók. Ezeken túl vízben a szolvatációs dinamikára utaló 500 fs-os időállandót is sikerült kimutatnom. Az általam elsőként tanulmányozott *flavocitokróm C* fluoreszcencia kinetika minden más környezetnél nagyobb mértékű kioltást mutatott, ami a kromofórnak az aminosav oldalláncokkal való erős kölcsönhatására utal. A széles idő- és spektrális tartományban végzett és új, igen hatékony módszerrel kiértékelt kísérletek a FAD fluoreszcencia mechanizmusának minden eddiginél komplexebb leírását eredményezték [J3, J4, C10, C17, C19, C21, K6].

4. Femtoszekundumos pumpa-próba módszerrel megmértem a NADH tranziens abszorpcióját 0, 50, 70 és 80 % metanol koncentrációkon, ami a molekula különböző konformációs állapotairól ad információt. A mért adatok globális analízise eredményeként az abszorpció kinetikák 250 fs, 3 ps és 350 ps időállandókkal voltak jellemezhetőek. A 250 fs-os időállandó az adenin csoport gerjesztett állapotú abszorpciójának tulajdonítható. A második és a harmadik komponens metanol-mentes minta esetében rendelkezik nagy amplitúdó értékkel. Ezek a megfigyelések azt mutatják, hogy vízben az energiaátadás az adenintől a nikotinamidhoz 3 ps időállandóval jellemezhető, majd a nikotinamid csoport a gerjesztett állapotból 350 ps alatt tér vissza alapállapotba. Növekvő metanol koncentrációval az energiaátadást biztosító zárt konformáció populációja egyre csökken [J5, C18], ami a fenti lassú komponensek súlyának csökkenéséhez vezet.

6.2. ANGOL NYELVŰ ÖSSZEFOGLALÓ

SUMMARY OF DISSERTATION

I. Introduction

A new dawn of optics has started in 1960, with the development of the first laser. In 1964, invention of mode locking allowed the generation of ultrashort pulses and 20 years later the pulse duration reached 27 fs with the use of prism compressors. Since, the continuous evolution of lasers has contributed to a lot of scientific discoveries in almost all research areas of natural sciences. However, in many applications one needs much more energy than that an oscillator can provide. From the 70's, this demand of high-energy ultrashort pulses led to the intensive research of short-pulse amplification. By using amplified pulses of 10^{10} W/cm² intensity we are able to investigate the theoretically foreseen nonlinear effects of light-matter interactions. In the last 15-20 years a lot of new results have emerged in the interdisciplinary fields of femtochemistry and femtobiology and the pioneering work of Ahmed H. Zewail was awarded with the Nobel-prize in chemistry. Nowadays, the pump-probe technique developed by him is a very effective tool in the hands of researchers investigating ultrafast biological and chemical processes.

This thesis deals with the spectroscopic applications of ultrashort laser pulses. In my experiments, either femtosecond pulses of nJ energy or amplified pulses of several mJ were used, depending on the requirements of the corresponding experiment.

The thesis is separated into two parts. First, a possible application of the membrane protein bacteriorhodopsin (bR) in optical communication is demonstrated. In the second part, two biologically important coenzymes, *flavin adenine dinucleotide* (FAD) and the reduced form of *nicotinamide adenine dinucleotide* (NADH) are investigated by means of femtosecond time-resolved spectroscopy. These coenzymes play a role in the energy producing processes of the cells by converting chemical energy to useful metabolic energy (in the electron transport chain), which provides information about the metabolic state of the cells.

II. Scientific objects and goals

One of the objects of my biophysical investigations is *bacteriorhodopsin*, a light energy converting protein found in the cell membrane of *Halobacterium salinarum*, which has been one of the most significant molecules of the biological and biophysical research of the past 30 years. Upon light absorption, the protein pumps a proton across the membrane from the cytoplasm to the extracellular moiety and the generated electrochemical gradient is further used for ATP synthesis. During the proton translocation process the protein undergoes a cyclic change of conformational states with well distinguishable absorption spectra. The consequent light-induced refractive index change offers the possibility of a wide range of applications in photonics, nonlinear optics, and bioelectronics. In spite of bR being used in several optical devices and applications, experimental data on its concentration-dependent refractive index and optical dispersion are not available. Therefore, one of my aims was **(1) to measure the concentration-dependent refractive index of bacteriorhodopsin suspensions and to determine its Sellmeier-coefficients in the visible range of the spectrum.**

The speed and bandwidth of today's telecommunication components are continuously growing, the desired 1 Tbit/s trafficking rate is thought to be achieved by using all-optical data processing devices. One of the biggest challenges in integrated optics (IO) is to find new materials of proper nonlinear optical (NLO) properties which can play an active, controlling role in integrated optical circuits. Besides inorganic crystals, materials of biological origin are also considered for use as active elements in IO devices, among which the *bacteriorhodopsin* has generated the most interest. Due to its favorable NLO properties and mechanical stability, bR is a promising candidate as an active material in future photonic applications. **(2) In order to demonstrate the feasibility of a protein-based integrated optical device, I investigated the subpicosecond (BR→I) transition of the protein photocycle by means of ultrafast pump-probe techniques and a waveguide-based photonic structure.**

An important part of my research activities conducted at the Institute of Biophysics was the development of a fluorescence kinetic measuring system based on optical frequency up-conversion, by which the fluorescence of different natural and artificial chromophores can be monitored with a good time-resolution in a wide spectral range. Among the most important autofluorescent molecules are the coenzymes FAD and NADH, which play a key role in the redox processes of the molecular respiratory chain. The *in vivo* fluorescence decay rates of these molecules are often used to characterize healthy and diseased cells and tissues. However, we have very few experimental data about how the individual components (e.g.

polarity of solvent, pH, etc.) of the cell's micro-environment affect these characteristic rate constants. Comparison of the experimental findings concerning the effects of these parameters with the *in vivo* results can be important in future medical applications. **(3) My aim was to measure the effect of different micro-environments on the fluorescence lifetime of coenzyme FAD on the 100 fs – 10 ns timescale. The molecule was investigated both in its free forms in different solvents and when bound to a protein.**

The coenzyme NADH has two chromophores (*nicotinamide* and *adenine*) between which an efficient FRET (fluorescence resonance energy transfer) process can occur. The efficiency of the energy transfer is strongly dependent on the conformational state of the molecule. **(4) In order to deeply understand the intramolecular processes following excitation, I used ultrafast transient absorption measurement techniques to investigate the open and closed conformations of the coenzyme.**

III. Materials and methods

The experiments were conducted using femtosecond light sources including Ti:sapphire oscillators and chirped pulse amplifiers (CPAs). In the following subsections, I describe the experimental methods and setups used in my work together with the preparation of biological samples.

1. The sample used in the measurement of the concentration dependent refractive index of bR was obtained in the form of suspension from the Institute of Biophysics, Biological Research Centre of HAS. The concentrations between 0 and 80 μM were set using 10 mM, pH 7.0 Tris(hydroxymethyl)-aminomethane buffer (Sigma-Aldrich Co. LLC).

To determine the refractive indices of the liquid samples, we have chosen a classical yet robust refractometry method based on the measurement of the angle of minimal deviation. The sample suspensions were filled into a hollow prism, which was then inserted into a goniometer. The eyepiece of the goniometer was replaced with a camera sensitive in the near IR. In order to cover the selected wavelength range, two types of light sources were used. In the wavelength range of 390–780 nm, the light of a Xe lamp with a power of 1 kW was collimated by achromatic lenses. The required wavelength was selected by an SPM-2 monochromator having a bandwidth of 0.4 nm, so that the peak spectral power at the sample never exceeded 60 μW within the 390–780 nm range. Hence, the effect of photobleaching could be neglected. For the wavelength range of 780–880 nm, femtosecond laser pulses from

a 70 MHz Ti:Sa laser oscillator were used. A quasi-monochromatic component of the 100 nm bandwidth (FWHM) pulses was selected by a Jobin Yvon H20UV monochromator and then was imaged onto the surface of the hollow prism.

These measurements were carried out using the Ti:sapphire oscillator and a high pressure Xe lamp at the TeWaTi Laboratory, Department of Optics and Quantum Electronics, University of Szeged, under the supervision of Dr. Karoly Osvay.

2. The feasibility study of ultrafast optical switching was conducted in the pump-probe scheme utilizing the 10 Hz, 800 nm amplified pulses of a TW-class laser system. The beam was split into two parts. By injecting the more intense beam into an optical parametric amplifier followed by a sum frequency mixer and a compressor, 150 fs, 80 μ J green pump pulses were generated. These pulses excited the absorption band of bR at a center wavelength of 530 nm, starting the photocycle of the membrane protein. The probe pulses were obtained from the less intense beam by utilizing a 1800 1/mm line density gold grating, a slit, and a Fabry-Perot interferometer (finesse $\approx$ 50) to narrow the spectrum yielding 1 μ J pulse energy and a bandwidth of 0.2 nm near 790 nm. The transform limited pulse duration was 3 ps. After propagating through a delay line, the probe pulses were directed onto a plane, grating coupled waveguide coated with a bR film. The change in the light intensity coupled into the waveguide under an appropriate angle of incidence was measured with a fast photodiode (Thorlabs, DET10A) and a multichannel oscilloscope (LeCroy WaveRunner 6100A).

These measurements were carried out using the hybrid laser- and optical parametric chirped pulse amplifier system at the TeWaTi Laboratory, Department of Optics and Quantum Electronics, University of Szeged, under the supervision of Dr. Karoly Osvay and Dr. Andras Der.

3. The FAD sample was purchased from Sigma-Aldrich Co. LLC. For my measurements, I prepared a 3 mM stock solution in 50 mM, pH 7.0 phosphate buffer, which was diluted in 1:1 ratio with tri-distilled water, dioxane, ethanol, and DMSO solutions to keep the FAD concentration at a constant value of 1.5 mM. The flavocytochrome-bound FAD sample was obtained from Dr. Csaba Bagyinka and Dr. Gabor Rakhely.

For time-resolved fluorescence measurements, we have recently constructed a Ti:sapphire laser oscillator based apparatus capable of measuring time-resolved fluorescence both with the technique of frequency up-conversion and time correlated single photon counting (TCSPC). The output beam of the laser oscillator was split into two beams providing the optical pump and the gate pulses, respectively. The pulses traveling in the pump beamline

were focused into a beta-barium borate (BBO) crystal in order to generate their second harmonic. The fluorescence emitted as a result of exciting the sample by the so obtained pump beam was collected and focused by a pair of large aperture off-axis parabolic mirrors onto a second BBO crystal constituting the frequency up-conversion unit, where it was sum frequency mixed with the gate pulses. The generated frequency up-converted beam was then focused onto the entrance slit of a monochromator. A liquid nitrogen cooled 1024x256 pixel CCD was mounted on one of the exit ports of the monochromator making it possible to detect all the spectral components simultaneously. A 300 line/mm optical diffraction grating was used to spectrally disperse the beam. In the case of TCSPC, the fluorescence was directly imaged onto the entrance slit of the monochromator instead of traveling through the up-conversion unit. The second output port of the monochromator had an avalanche photodiode (IDQuantique, ID-100) mounted onto it, which was connected to a single photon counting electronic unit (Becker & Hickl GmbH).

These measurements were carried out using a femtosecond Ti:sapphire oscillator at the Laboratory for Femtobiology of the Institute of Biophysics, Biological Research Centre of HAS (Szeged, Hungary) under the supervision of Dr. Geza Groma.

4. In the case of measurements of absorption kinetics, a 3.0×10^{-4} M NADH solution was prepared freshly in 0.1 M PIPES (1,4-Piperazine-diethanesulfonic acid) buffer in pH = 7.0 and was kept at 24 °C during the measurements. This buffer was proven optimal in avoiding thermal NADH degradation. The equilibrium ratio of the folded and unfolded conformational states was controlled by the methanol concentration of the sample. Time-dependent differential absorption spectra upon excitation of the adenine group were measured at 0, 50, 70 and 80 % methanol concentrations.

Femtosecond absorption kinetics measurements were carried out by the standard pump-probe method. The excitation pulses were obtained at 266 nm by third harmonic generation of an amplified Ti:sapphire laser system (5 kHz, 40 fs, 500 μ J). A white light continuum pulse train was generated by focusing a small portion of the fundamental beam into a piece of bulk material and the 330-630 nm range was selected by spectral filters. The pulses were then split into two beams before reaching the sample: one serving as the probe beam, while the other provided a reference for determining the accurate absorption changes. After the sample, the probe and reference pulses were directed into a monochromator and the spectra were detected by a cooled CCD camera. The time resolution of the kinetic measurements was ~ 100 fs. A 0.5 mm diameter square-aperture quartz cuvette was used as

sample holder where the liquid samples were circulated using a peristaltic pump. Data analysis and evaluation was performed using Matlab codes including time- and spectral calibration results, background correction data and SVD filtering. The data were then corrected for the solvent response, pump-probe two-photon absorption and solvated electron signals.

These measurements were carried out using an amplified Ti:sapphire laser system at the laboratory of the CNRS-IPCMS DON (Department of Optics and Nanophotonics, Strasbourg, France) under the guidance of Prof. Stefan Haacke.

IV. New scientific results

My scientific results are summarized in the following thesis statements:

1. From the measurements of the angle of minimum deviation, I have calculated the refractive index values of bR taking into account the temperature and pressure dependent Sellmeier equation of air. First, I have determined the refractive index of TRIS buffer, then the refractive indices of bR suspensions with different concentration in the wavelength range between 390 and 880 nm. For the first time I have published the Sellmeier coefficients of TRIS buffer and bR suspensions [J1, C1-C4, K1-K3].
2. Employing pump-probe measurements on a thin bR film dried onto the surface of an integrated optical waveguide, I have demonstrated that the peak of resonance of the mode coupled into the waveguide shifts after excitation on a sub-picosecond timescale due to the index change induced by the absorption of bR. Based on the comparison of my measurement results with the time constants of the photocycle of bR, I have confirmed that the amplitude of the measured signal is controlled by the index change during the BR→I transition. The results suggest that the BR→I transition of the photocycle of bR can be exploited for ultrafast switching based purely on optical principles [J2, C5-C9, C11-C16, C20, K4, K5].
3. I have participated in the construction and calibration of a complex apparatus for the measurement of femtosecond time-resolved fluorescence kinetics. I have measured the fluorescence kinetics of FAD in a wide time- and spectral range in water, water–dioxane, water–ethanol, water–DMSO solutions. The fluorescence kinetics was also investigated when the FAD molecule was bound to flavocytochrome, which helps to understand the intra- and extramolecular interactions of the coenzyme. Employing a new evaluation

algorithm for the first time (Basis Pursuit Denoising), I have determined that the fluorescence of FAD is characterized by four decay components, which can be attributed to one open and three closed conformations. In addition, a 500-fs time constant was also identified and linked to salvation dynamics in water. FCC fluorescence kinetics, which was studied for the first time in this work, showed quenching larger than in all other environments, which suggests a strong interaction between the chromophore and the amino acid side chains. The experiments conducted in a wide temporal and spectral range and the data analyzed using new and very efficient methods resulted in a model of the fluorescence mechanisms of FAD, which is more thorough and complex than the earlier models in the literature [J3, J4, C10, C17, C19, C21, K6].

4. I have measured the transient absorption of NADH using a femtosecond pump-probe technique at 0%, 50%, 70%, and 80% methanol concentrations, which provide information about the different conformational states of the molecule. The global analysis of the measured data yielded the time constants of 250 fs, 3 ps, and 350 ps. The 250-fs time constant can be attributed to the excited state absorption of the adenine group. The other two decay components have large amplitude values in methanol-free samples. These observations suggest that the energy transfer in water from adenine to nicotinamide is characterized by a 3-ps time constant, while the nicotinamide group returns to the ground state in 250 ps. The population of the closed conformational state, which facilitates energy transfer, gradually decreases with increasing methanol concentration [J5, C18], which leads to a decrease of the weight of the above slow components.

6.3. A TÉZISEK ALAPJÁT KÉPEZŐ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

REFERÁLT FOLYÓIRATOKBAN, KÖNYVFEJEZETEK BEN

- J1. **Z. Heiner**, K. Osvay
Refractive Index of Dark-Adapted Bacteriorhodopsin and TRIS Buffer between 390-880 nm
Applied Optics **48**, 4610-4615, 2009
- J2. L. Fábán, **Z. Heiner**, M. Mero, M. Kiss, E. Wolff, P. Ormos, K. Osvay, A. Dér
Protein-based ultrafast photonic switching
Optics Express **19**, 18861-18870 (2011)
- J3. G. I. Groma, **Z. Heiner**, A. Makai, F. Sarlos
Estimation of kinetic parameters from time-resolved fluorescence data: A compressed sensing approach
RSC Advances **2**, 11481-11490 (2012)
- J4. **Z. Heiner**, A. Makai, F. Sarlós, C. Bagyinka, A. Tóth, G. Rákhely, G. I. Groma
Fluorescence Kinetics of Flavin Adenine Dinucleotide in Different Microenvironments
EPJ Web of Conferences **41**, 07021 (2013)
- J5. **Z. Heiner**, T. Roland, S. Haacke, G. I. Groma
Ultrafast Absorption Kinetics of NADH in Folded and Unfolded Conformations
EPJ Web of Conferences **41**, 07003 (2013)

REFERÁLT ÉS PUBLIKÁLT KONFERENCIA-KIADVÁNYOKBAN

- C1. **Z. Heiner**, G. Szalay, K. Osvay:
Ultrafast dispersion measurement of bR in the near IR range
EOS Annual Meeting 2006, Paris, France, P13, 2006
- C2. G. Szalay, **Z. Heiner**, K. Osvay:
Dispersion of dark Bacteriorhodopsin at 800 nm
ECAMP IX. 2007, Crete, Greece, paper Tu3-1, 2007
- C3. **Z. Heiner**, G. Szalay, K. Osvay
Refractive Index and Dispersion Measurement of Dark-Adapted Wild Type Bacteriorhodopsin
Trends of Laser Applications in Biology and Biomedicine, Heraklion, Greece 2008 (szóbeli előadás)
- C4. **Z. Heiner**, K. Osvay
Measurement of the Concentration Dependent Refractive Index of Dark-Adapted Wild-type Bacteriorhodopsin in 390-880 nm
CLEO®/Europe-EQEC 2009, Munich, Germany, paper: CL1.2 THU (szóbeli előadás)
- C5. L. Fábán, M. Mero, **Z. Heiner**, K. Osvay, A. Dér
Ultrafast Integrated Optical Switching Based on the Protein Bacteriorhodopsin
SPIE Photonics Europe 2010, Brussels, Belgium (szóbeli előadás)
- C6. L. Fábán, M. Mero, **Z. Heiner**, M. Kiss, K. Osvay, A. Dér
Ultrafast Integrated Optical Switching Based on the Protein Bacteriorhodopsin
CLEO 2010, San Jose, USA (szóbeli előadás)
- C7. **Z. Heiner**, L. Fábán, M. Mero, M. Kiss, K. Osvay, A. Dér
Ultrafast, Protein-Based All-Optical Switching
Ultrafast Phenomena 2010, Snowmass, Colorado United States, ThE18
- C8. A. Dér, L. Fábán, **Z. Heiner**, M. Kiss, M. Mero, K. Osvay
Ultrafast all-optical switching and dispersion of the protein Bacteriorhodopsin
ICOOPMA10 2010, Budapest, Hungary (meghívott szóbeli előadás)
- C9. **Z. Heiner**, L. Fábán, M. Mero, M. Kiss, A. Dér, K. Osvay
Bacteriorhodopsin based ultrafast all-optical switching
10th European Conference on Atoms Molecules and Photons 2010, Salamanca, Spain, paper 758
- C10. **Z. Heiner**, A. Makai, G. I. Groma
Ultrafast fluorescence kinetics measurement based on up-conversion method
COST Meeting & Training School, Nonlinear Nanophotonics 2010, Visegrád, Hungary
- C11. Pal Ormos, L. Fabian, **Z. Heiner**, M. Mero, M. Kiss, E. Wolff, K. Osvay, A. Der
Subpicosecond photonic switching based on bacteriorhodopsin
55th Annual Meeting of Biophysical Society 2011, Baltimore, USA, 2634-Pos/B620
- C12. Pal Ormos, L. Fabian, **Z. Heiner**, M. Mero, M. Kiss, E. Wolff, K. Osvay, A. Der
Subpicosecond photonic switching based on bacteriorhodopsin
APS March Meeting 2011, Volume 56, Number 2 (S1.00068)

- C13. L. Fábíán, **Z. Heiner**, M. Mero, M. Kiss, E.K. Wolff, P. Ormos, K. Osvay, A. Der
Ultrafast photonic switching based on the protein bacteriorhodopsin
SPIE Optics and Optoelectronics 2011 Prague, Czech Republic [8071-39]
- C14. L. Fábíán, **Z. Heiner**, M. Mero, M. Kiss, E.K. Wolff, P. Ormos, K. Osvay, A. Der
Subpicosecond all-optical switching by the protein bacteriorhodopsin
VIII. European Biophysics Congress 2011 Budapest, Hungary [P-760]
- C15. L. Fábíán, **Z. Heiner**, M. Mero, M. Kiss, E. Wolff, P. Ormos, K. Osvay, A. Der
Subpicosecond all-optical switching by the protein bacteriorhodopsin
European Biophysics Journal **40** S236 (2011)
- C16. L. Fábíán, **Z. Heiner**, M. Mero, M. Kiss, E.K. Wolff, P. Ormos, K. Osvay, A. Der
Protein-based ultrafast all-optical switching
13th International Conference-School (2011) "Advanced Materials and Technologies" Palanga, Lithuania [P39]
- C17. **Z. Heiner**, A. Makai, F. Sarlós, Cs. Bagyinka, A. Tóth, G. Rákhely, G. I. Groma
Fluorescence Kinetics of Flavine Adenine Dinucleotide in Different Microenvironments
18th International Conf. on Ultrafast Phenomena Lausanne, Svájc (2012) [MON.PI.76]
- C18. **Z. Heiner**, T. Roland, S. Haacke, G. I. Groma
Ultrafast Absorption Kinetics of NADH in Folded and Unfolded Conformations
18th International Conf. on Ultrafast Phenomena Lausanne, Svájc (2012) [MON.PI.76]
- C19. **Z. Heiner**, A. Makai, F. Sarlós, Cs. Bagyinka, A. Tóth, G. Rákhely, G. I. Groma
Ultrafast time-resolved fluorescence of Flavine Adenine Dinucleotide
Regional Biophysics Conference 2012, Kladovo-Belgrád, Szerbia [P2.S1]
- C20. L. Fábíán, **Z. Heiner**, M. Mero, M. Kiss, E. K. Wolff, P. Ormos, K. Osvay, A. Der
Protein-based ultrafast all-optical switching
The 11th Greta Pifat Mrzljak International School of Biophysics, Primosten, Croatia (2012) Book of Abstracts P25
- C21. **Z. Heiner**, A. Makai, F. Sarlós, G. I. Groma
A compressed sensing approach for kinetic parameter estimation from time-resolved fluorescence data
Chemometrics in Time-Resolved and Imaging Spectroscopy, Lille, France (2012)

EGYÉB KONFERENCIÁKON

- K1. **Z. Heiner**, G. Szalay, K. Osvay
The dispersion of dark-adapted bacteriorhodopsin at 800 nm
STRAUB-NAPOK, Szeged, Biophysics Section, 2007
- K2. **Z. Heiner**, K. Osvay
A bakteriorodopszin törésmutatójának mérése a 390-880 nm közötti tartományon
Kvantumelektronika 2008, Budapest
- K3. **Z. Heiner**, K. Osvay
A bakteriorodopszin koncentrációfüggő diszperziójának mérése a közeli infravörös tartományon
MBFT XXIII. Kongresszusa, Pécs, P42 (2009)
- K4. **Z. Heiner**, L. Fábíán, M. Merő, M. Kiss, A. Der, K. Osvay
Ultragyors optikai fénykapcsolás fehérjével
Fizikus Vándorgyűlés, 2010, Pécs (szóbeli előadás)
- K5. László Fábíán, **Zsuzsanna Heiner**, Mark Mero, Miklós Kiss, Elmar K. Wolff, Pál Ormos, Károly Osvay and András Der:
Protein-based ultrafast photonic switching
Straub Days, 2010, Szeged, Hungary (szóbeli előadás)
- K6. **Z. Heiner**, A. Makai, F. Sarlós, G.I. Groma
Ultrafast fluorescence kinetics measurements based on up-conversion method
Straub Days, 2010, Szeged, Hungary

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

RÖVITÍTÉS	ANGOL NYELVŰ KIFEJEZÉS	MAGYAR NYELVŰ KIFEJEZÉS
ADP	adenosin diphosphate	adenozin difoszfát
ATP	adenosin triphosphate	adenozin trifoszfát
BBO	β -Barium-Borate (β -BaB ₂ O ₄)	β -Bárium-Borát (β -BaB ₂ O ₄)
BPDN	basis pursuit denoising	Basis Pursuit Denoising
bR	bacteriorhodopsin	bakteriorodopszin
CCF	cross-correlation function	keresztkorrelációs függvény
CCW	counter clockwise	óramutató járásával ellentétes
CEP	carrier-envelope phase	hordozó-burkoló fázis
CPA	chirped pulse amplification	fázismodulált impulzuserősítés
CW	clockwise	óramutató járásával megegyező
DAS	decay-associated spectrum	amplitúdó spektrum
ESA	excited state absorption	gerjesztett állapoti abszorpció
FAD	flavin adenine dinucleotide	flavin adenin dinukleotid
FCC	flavocytocrome C	flavocitokróm C
FLIM	fluorescence lifetime imaging	fluoreszcencia élettídhő képalkotás
FRET	Förster resonance energy transfer <i>or</i>	Förster-rezonancia energiaátadás <i>vagy</i>
	Fluorescence resonance energy transfer	fluoreszcencia rezonancia energiaátadás
GD	group delay	csoportkésleltetés
GDD	group delay dispersion	csoportkésleltetés-diszperzió
IC	internal conversion	belső átalakulás
IRF	instrument response function	készülék átviteli függvény
ISC	intersystem crossing	rendszerek közti átmenet
NAD	nicotinamide adenine dinucleotide	nikotinamid adenin dinukleotid
NADH	reduced nicotinamide adenine dinucleotide	redukált nikotinamid adenin dinukleotid

NLO	nonlinear optical	nem-lineáris optikai
OD	optical density	optikai denzitás
OPCPA	optical parametric chirped-pulse amplification	optikai parametrikus fázismodulált impulzuserősítés
OWLS	optical waveguide lightmode spectroscopy	optikai hullámvezető módusspektroszkópia
RPET	relative probability for energy transfer	energiatranszfer képessége
SE	stimulated emission	stimulált emisszió
SFG	sum-frequency generation	összegfrekvencia keltése
SHG	second harmonic generation	másodharmonikus keltése
SPR	surface plasmon resonance	felületi plazmon rezonancia
SVD	singular value decomposition	szinguláris értékek szerinti felbontás
TAC	time-amplitude converter	idő-amplitudó átalakító
TCSPC	time-correlated single photon counting	időkorrelált egy-foton számláló
TE	transverse electric	transzverzális elektromos
TM	transverse magnetic	transzverzális mágneses
TOD	third order dispersion	harmadrendű diszperzió
TPA	two photon absorption	kétfotonos abszorpció
WLC	white light continuum	fehér fény kontinuum

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton fejezem ki köszönetemet témavezetőimnek, Dr. Osvay Károlynak és Dr. Groma Gézának, hogy bizalmukkal, irányításukkal és útmutatásukkal mindezidáig a helyes út irányába tereltek, és irányt adtak kutatásaimnak. Köszönöm, hogy részt vehettem a Szegedi Biológia Központban egy új femtoszekundumos labor felépítésében, amelynek során nagyon sok ismeretet sajátítottam el mind a szinkronpumpált optikai parametrikus oszcillátorokról, mind pedig az időbontott fluoreszcencia spektroszkópiai módszerekről. Köszönet témavezetőim türelméért – s egyben bocsánat az esetlegesen okozott ősz hajszálakért. Hálásan köszönöm Dr. Stefan Haacke-nak, hogy lehetőséget adott a csoportjában dolgozni, és nagyon sok új elméleti és kísérleti ismereteket szerezhettem az időbontott spektroszkópia területén.

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Bor Zsolt, Dr. Szabó Gábor és Dr. Rácz Béla professzor úrnak, hogy lehetővé tették számomra, hogy az SZTE Optikai és Kvantumelektronikai Tanszéken kutatómunkát folytathassak, illetve bekapcsolódhassak az SZTE Fizikai Doktori Iskola ösztöndíjasainak körébe.

Köszönöm a TeWaTi csoport 2002–2008 tagjainak tanácsait, észrevételeit. Kiemelten köszönöm Börzsönyi Ádámnak, hogy a számítógépek ellen küldött negatív impulzusaim korrigálta közös munkáink során.

Hálás köszönetem fejezem ki Makai András, Fábián László és Dr. Dér András SZBK-s kollégáim felé, akiktől sokat tanulhattam. Köszönöm Dr. Ormos Pál akadémikusnak, hogy lehetőséget adott a Szegedi Biológiai Központ Biofizikai Intézetében zajló kutatásokba bekapcsolódni, mint MTA Fiatal Kutató.

Köszönöm egykori témavezetőmnek, Dr. Vinkó Józsefnek is, hogy hallgató koromban megtanított tanulni, s egyben köszönöm az „első szegedi csillagász diplomát kapott” évfolyamtársaimnak is a küzdésszellem és a szakmai rajongásaim kialakításában való közreműködését.

Hálás köszönet illeti Kedvesem, Gyermekeim, Szüleim, Nagyszüleim, Nagybátyáim és Barátaim is, akik elviseltek, segítettek, formáltak. És kitartanak velem jóban–rosszban... hagyva, hogy a magam útját járjam...

Köszönöm!

Szeged, 2013. május

Heiner Zsuzsanna
MTA SzBK, Biofizikai Intézet

A dolgozatban közölt eredmények elérését az OTKA K75149, az NKFP 1/00007/2005, a TÁMOP-4.2.1, a TÁMOP-4.2.2, a TECH-09 valamint az Európai Regionális Projektek támogatták. A strasbourg-i csoporton keresztül pedig köszönet O. Crégut technikai segítségéért.

IRODALOMJEGYZÉK

1. L. E. Hargrove, R. L. Fork, and M. A. Pollock, "*Locking of He-Ne laser modes induced by synchronous intracavity modulation*" Applied Physics Letters **5**, 4-5 (1964)
2. O. E. Martinez, J. P. Gordon, and R. L. Fork, "*Negative group-velocity dispersion using refraction*" JOSA A **1**, 1003-1006 (1984)
3. R. L. Fork, O. E. Martinez, and J. P. Gordon, "*Negative dispersion using pairs of prisms*" Optics Letters **9**, 150-152 (1984)
4. Zs. Bor, and B. Rácz, "*Group velocity dispersion in prisms and its application to pulse compression and travelling-wave excitation*" Optics Communications **54**, 165-170 (1985)
5. J. A. Valdmanis, R. L. Fork, and J. P. Gordon, "*Generation of optical pulses as short as 27 femtoseconds directly from a laser balancing self-phase modulation, group-velocity dispersion, saturable absorption, and saturable gain*" Optics Letters **10**, 131-133 (1985)
6. F. X. Kärtner, N. Matuschek, T. Schibli, U. Keller, H. A. Haus, C. Heine, R. Morf, V. Scheuer, M. Tilsch, and T. Tschudi, "*Design and fabrication of double-chirped mirrors*" Optics Letters **22**, 831-833 (1997)
7. G. Tempea, V. Yakovlev, B. Bacovic, F. Krausz, and K. Ferencz, "*Tilted-front-interface chirped mirrors*" JOSA B **18**, 1747-1750 (2001)
8. R. Szipöcs, F. Kárpát, C. Spielmann, and F. Krausz, "*Chirped multilayer coatings for broadband dispersion control in femtosecond lasers*" Optics Letters **19**, 201-203 (1994)
9. D. H. Sutter, G. Steinmeyer, L. Gallmann, N. Matuschek, F. Morier-Genoud, U. Keller, V. Scheuer, G. Angelow, and T. Tschudi, "*Semiconductor saturable-absorber mirror assisted Kerr-lens mode-locked Ti:sapphire laser producing pulses in the two-cycle regime*" Optics Letters **24**, 631-633 (1999)
10. A. Apolonski, A. Poppe, G. Tempea, Ch. Spielmann, Th. Udem, R. Holzwarth, T. W. Hänsch, and F. Krausz, "*Controlling the Phase Evolution of Few-Cycle Light Pulses*" Phys. Rev. Lett. **85**, 740-743 (2000)
11. V.S. Yakovlev, P. Dombi, G. Tempea, C. Lemell, J. Burgdörfer, T. Udem, and A. Apolonski, "*Phase-stabilized 4-fs pulses at the full oscillator repetition rate for a photoemission experiment*" Applied Physics B **76**, 329-332 (2003)

12. A. Baltuska, Th. Udem, M. Uiberacker, M. Hentschel, E. Goulielmakis, Ch. Gohle, R. Holzwarth, V. S. Yakovlev, A. Scrinzi, T. W. Hänsch, and F. Krausz, "*Attosecond control of electronic processes by intense light fields*" *Nature* **421**, 611-615 (2003)
13. C. V. Shank, R. L. Fork, R. F. Leheny, and J. Shah, "*Dynamics of Photoexcited GaAs Band-Edge Absorption with Subpicosecond Resolution*" *Phys. Rev. Lett.* **42**, 112-115 (1979)
14. D. Strickland, and G. Mourou, "*Compression of amplified chirped optical pulses*" *Optics Communications* **56**, 219-221 (1985)
15. P. Maine, D. Strickland, P. Bado, M. Pessot, and G. Mourou, "*Generation of ultrahigh peak power pulses by chirped pulse amplification*" *IEEE Journal of Quantum Electronics* **24**, 398-403 (1988)
16. C. Rouyer, É. Mazataud, I. Allais, A. Pierre, S. Seznec, C. Sauteret, G. Mourou, and A. Migus, "*Generation of 50-TW femtosecond pulses in a Ti:sapphire/Nd:glass chain*" *Opt. Lett.* **18**, 214-216 (1993)
17. M. Dantus, R. M. Bowman, and A. H. Zewail, "*Femtosecond laser observations of molecular vibration and rotation*" *Nature* **343**, 737-739 (1990)
18. A. H. Zewail, "*Laser femtochemistry*" *Science* **242**, 1645-1653 (1988)
19. A. H. Zewail, "Femtochemistry: Atomic-Scale Dynamics of the Chemical Bond Using Ultrafast Lasers (Nobel Lecture)," in *Femtochemistry*(Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001), pp. 1-85.
20. W. Stoeckenius, and R. Rowen, "*A morphological study of Halobacterium Halobium and its lysis in media of low salt concentration*" *The Journal of Cell Biology* **34**, 365-393 (1967)
21. R. H. Lozier, R. A. Bogomolni, and W. Stoeckenius, "*Bacteriorhodopsin: a Light-Driven Proton Pump in Halobacterium Halobium*" *Biophysical Journal* **15**, 955-962 (1975)
22. D. Oesterhelt, and W. Stoeckenius, "*Functions of a new photoreceptor membrane*" *Proceedings of the National Academy of Sciences* **70**, 2853-2857 (1973)
23. O. Beja, L. Aravind, E. V. Koonin, M. T. Suzuki, A. Hadd, L. P. Nguyen, S. B. Jovanovich, C. M. Gates, R. A. Feldman, J. L. Spudich, E. N. Spudich, and E. F. DeLong, "*Bacterial Rhodopsin: Evidence for a New Type of Phototrophy in the Sea*" *Science* **289**, 1902-1906 (2000)

24. H. G. Khorana, G. E. Gerber, W. C. Herlihy, C. P. Gray, R. J. Anderegg, K. Nihei, and K. Biemann, "*Amino acid sequence of bacteriorhodopsin*" *Proceedings of the National Academy of Sciences* **76**, 5046-5050 (1979)
25. L.-O. Essen, "*Halorhodopsin: light-driven ion pumping made simple?*" *Current Opinion in Structural Biology* **12**, 516-522 (2002)
26. H. Luecke, "*Atomic resolution structures of bacteriorhodopsin photocycle intermediates: the role of discrete water molecules in the function of this light-driven ion pump*" *BBA* **1460**, 133-156 (2000)
27. J. A. Stuart, D. L. Marcy, and R. R. Birge, "Photonic and optoelectronic application of bacteriorhodopsin," in *Bioelectronic Applications of Photochromic Pigments*, A. Dér, and L. Keszthelyi, eds. (2001), pp. 15-29.
28. S. P. Balashov, "*Photoreactions of the photointermediates of bacteriorhodopsin*" *Israel Journal of Chem* **35**, 415-428 (1995)
29. P. Ormos, Z. Dancsházy, and L. Keszthelyi, "*Electric response of a back photoreaction in the bacteriorhodopsin photocycle*" *Biophysical Journal* **31**, 207-213 (1980)
30. A. Colonna, G. I. Groma, and M. H. Vos, "*Retinal isomerization dynamics in dry bacteriorhodopsin films*" *Chem. Phys. Letters* **415**, 69-73 (2005)
31. G. Váró, and L. Keszthelyi, "*Photoelectric signals from dried oriented purple membranes of Halobacterium halobium*" *Biophysical Journal* **43**, 47-51 (1983)
32. A. C. Terentis, L. Ujj, H. Abramczyk, and G. H. Atkinson, "*Primary events in the bacteriorhodopsin photocycle: Torsional vibrational dephasing in the first excited electronic state*" *Chemical Physics* **313**, 51-62 (2005)
33. D. Zeisel, and N. Hampp, "*Spectral relationship of light-induced refractive index and absorption changes in bacteriorhodopsin films containing wildtype BR and the variant BR-D96N*" *J. Phys. Chem.* **96**, 7788-7792 (1992)
34. L. Fábíán, E. K. Wolff, L. Oroszi, P. Ormos, and A. Dér, "*Fast integrated optical switching by the protein bacteriorhodopsin*" *Appl. Phys. Lett.* **97**, 023305 (2010)
35. L. Zimányi, "*Analysis of the Bacteriorhodopsin Photocycle by Singular Value Decomposition with Self-Modeling: A Critical Evaluation Using Realistic Simulated Data*" *J. Phys. Chem. B* **108**, 4199-4209 (2004)
36. J. M. Hales, J. Matichak, S. Barlow, S. Ohira, K. Yesudas, J.-L. Bredas, J. W. Perry, and R. R. Marder, "*Design of polymethine dyes with large third-order optical nonlinearities and loss figures of merit*" *Science* **327**, 1485-1487 (2010)

37. S. A. Haque, and J. Nelson, "*Toward organic all-optical switching*" *Science* **327**, 1466-1467 (2010)
38. X. Hu, P. Jiang, C. Ding, H. Yang, and Q. Gong, "*Picosecond and low-power all-optical switching based on an organic photonic bandgap microcavity*" *Nature Photonics* **2**, 185-189 (2008)
39. A.Dér, L.Fábián, S.Valkai, and P.Ormos, "Az integrált optika biofizikai alkalmazásai " in *A kvantumoptika és –elektronika legújabb eredményei*, Z. Heiner, and K. Osvay, eds. (SzTE, 2006).
40. P. Ormos, L. Fabian, L. Oroszi, E. K. Wolff, J. J. Ramsden, and A. Der, "*Protein-based integrated optical switching and modulation* " *Appl. Phys. Lett.* **80**, 4060-4062 (2002)
41. A. Dér, P. Hargittai, and J. Simon, "*Time-resolved photoelectric and absorption signals from oriented purple membranes immobilized in gel*" *J. Biochem. Biophys. Meth.* **10**, 295-300 (1985)
42. D. Oesterhelt, C. Bräuchle, and N. Hampp, "*Bacteriorhodopsin: a biological material for information processing*" *Quarterly Reviews of Biophysics* **24**, 425-478 (1991)
43. J. A. Stuart, D. L. Marcy, K. J. Wise, and R. R. Birge, "*Volumetric optical memory based on bacteriorhodopsin*" *Synthetic Metals* **127**, 3-15 (2002)
44. Q. W. Song, C. P. Zhang, and R.R.Birge, "*Optical limiting by chemically enhanced bacteriorhodopsin films* " *Opt. Lett.* **18**, 775-777 (1993)
45. O. Werner, B. Fischer, A. Lewis, and I. Nebenzahl, "*Saturable absorption, wave mixing, and phase conjugation with bacteriorhodopsin*" *Opt. Lett.* **15**, 1117-1119 (1990)
46. K. Clays, S. Van Elshocht, M. Chi, E. Lepoudre, and A. Persoons, "*Bacteriorhodopsin: a natural, efficient (nonlinear) photonic crystal*" *J. Opt. Soc. Am. B* **18**, 1474-1482 (2001)
47. O. Bouevitch, A. Lewis, and M. Sheves, "*Probing Bacteriorhodopsin Photochemistry with Nonlinear Optics: Comparing the Second Harmonic Generation of bR and the Photochemically Induced Intermediate K*" *The Journal of Physical Chemistry* **99**, 10648-10657 (1995)
48. J. Y. Huang, Z. Chen, and A. Lewis, "*Second-harmonic generation in purple membrane-poly(vinyl alcohol) films: probing the dipolar characteristics of the bacteriorhodopsin chromophore in bR570 and M412*" *The Journal of Physical Chemistry* **93**, 3314-3320 (1989)

49. R. R. Schaller, *"Moore's law: past, present and future"* IEEE Spectrum **34**, 52-59 (1997)
50. W. W. Gibbs, *"Computing at the speed of light"* Sci.Am. **291**, 80-87 (2004)
51. Ádám, Dux, Faragó, Fésüs, Machovich, Mandl, and Sümegi, "Orvosi Biokémia," Á. Veronika, ed. (Medicina, Budapest, 2006).
52. Hrabák, Idei, Mészáros, Staub, Tóth, and Vér, *Biokémia - Aminosavak, peptidek, szénhidrátok, lipidek, nukleotidok, nukleinsavak, vitaminok és koenzimek szerkezete és tulajdonságai (jegyzet)* (Semmelweis Kiadó, 2006).
53. M. Brownlee, *"Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications"* Nature **414**, 813 (2001)
54. "<http://www.mikeblaber.org/oldwine/BCH4053/Lecture33/Lecture33.html>."
55. H. Chosrowjan, S. Taniguchi, N. Mataga, F. Tanaka, and A. J. W. G. Visser, *"The stacked flavin adenine dinucleotide conformation in water is fluorescent on picosecond timescale"* Chemical Physics Letters **378**, 354-358 (2003)
56. T. Nakabayashi, M. S. Islam, and N. Ohta, *"Fluorescence Decay Dynamics of Flavin Adenine Dinucleotide in a Mixture of Alcohol and Water in the Femtosecond and Nanosecond Time Range"* The Journal of Physical Chemistry B **114**, 15254-15260 (2010)
57. N. Nakashima, K. Yoshihara, F. Tanaka, and K. Yagi, *"Picosecond fluorescence lifetime of the coenzyme of D-amino acid oxidase"* Journal of Biological Chemistry **255**, 5261-5263 (1980)
58. Md. S. Islam, M. Honma, T. Nakabayashi, M. Kinjo, and N. Ohta, *"pH Dependence of the Fluorescence Lifetime of FAD in Solution and in Cells"* Int. J. Mol. Sci. **14**, 1952-1963 (2013)
59. R. V. Hull, P. S. Conger Iii, and R. J. Hoobler, *"Conformation of NADH studied by fluorescence excitation transfer spectroscopy"* Biophysical Chemistry **90**, 9-16 (2001)
60. L. Rover Jr, J. C. B. Fernandes, Graciliano de Oliveira Neto, L. T. Kubota, E. Katekawa, and S. H. P. Serrano, *"Study of NADH Stability Using Ultraviolet-Visible Spectrophotometric Analysis and Factorial Design"* Analytical Biochemistry **260**, 50-55 (1998)
61. A. S. Ladokhin, and L. Brand, *"Evidence for an excited-state reaction contributing to NADH fluorescence"* Journal of Fluorescence **5**, 99-106 (1995)

62. K. Blinova, S. Carroll, S. Bose, A. V. Smirnov, J. J. Harvey, J. R. Knutson, and R. S. Balaban, *"Distribution of Mitochondrial NADH Fluorescence Lifetimes: Steady-State Kinetics of Matrix NADH Interactions"* Biochemistry **44**, 2585-2594 (2005)
63. D. Chorvat, and A. Chorvatova, *"Multi-wavelength fluorescence lifetime spectroscopy: a new approach to the study of endogenous fluorescence in living cells and tissues"* Laser Physics Letters **6**, 175-193 (2009)
64. R. Richards-Kortum, and E. Sevick-Muraca, *"Quantitative Optical Spectroscopy for Tissue Diagnosis"* Annual Review of Physical Chemistry **47**, 555-606 (1996)
65. T. Nakabayashi, M.S. Islam, and N. Ohta, *"Fluorescence decay dynamics of flavin adenine dinucleotide in a mixture of alcohol and water in the femtosecond and nanosecond time range"* J. Phys. Chem. B **114**, 15254-15260 (2010)
66. M. C. Skala, K. M. Riching, A. Gendron-Fitzpatrick, J. Eickhoff, K. W. Eliceiri, J. G. White, and N. Ramanujam, *"In vivo multiphoton microscopy of NADH and FAD redox states, fluorescence lifetimes, and cellular morphology in precancerous epithelia"* Proceedings of the National Academy of Sciences **104**, 19494-19499 (2007)
67. D. Schweitzer, F. G. Holz, and R. Spaide, *"Metabolic Mapping: Medical Retina,"* G. K. Krieglstein, and R. N. Weinreb, eds. (Springer Berlin Heidelberg, 2010), pp. 107-123.
68. N. D. Evans, L. Gnudi, O. J. Rolinski, D. J. S. Birch, and J. C. Pickup, *"Glucose-dependent changes in NAD(P)H-related fluorescence lifetime of adipocytes and fibroblasts in vitro: Potential for non-invasive glucose sensing in diabetes mellitus"* Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology **80**, 122-129 (2005)
69. J. McGinty, N. P. Galletly, C. Dunsby, I. Munro, D. S. Elson, J. Requejo-Isidro, P. Cohen, R. Ahmad, A. Forsyth, A. V. Thillainayagam, M. A. A. Neil, P. M. W. French, and G. W. Stamp, *"Wide-field fluorescence lifetime imaging of cancer"* Biomed. Opt. Express **1**, 627-640 (2010)
70. R. Drezeck, K. Sokolov, U. Utzinger, I. Boiko, A. Malpica, M. Follen, and R. Richards-Kortum, *"Understanding the contributions of NADH and collagen to cervical tissue fluorescence spectra: Modeling, measurements, and implications"* Journal of Biomedical Optics **6**, 385-396 (2001)
71. B. E. A. Saleh, and M. C. Teich, *"Electromagnetic Optics,"* in *Fundamentals of Photonics* (John Wiley & Sons, Inc., 1991), pp. 157-192.
72. R. W. Boyd, *Nonlinear Optics* (Academic Press, 2008).
73. H. M. Nussenzveig, *Causality and Dispersion Relations* (Academic Press, New York, 1972).

74. F. Wooten, *Optical Properties of Solids* (Academic Press, New York, 1972).
75. P. W. Langhoff, and M. Karplus, "*Padé Summation of the Cauchy Dispersion Equation*" J. Opt. Soc. Am. **59**, 863-871 (1969)
76. S. Ciulli, and G. Nenciu, "*Weighted dispersion relations*" and *cut to cut extrapolations*" Communications in Mathematical Physics **26**, 237-246 (1972)
77. Sellmeier, "*Zur Erklärung der abnormen Farbenfolge im Spectrum einiger Substanzen*" Annalen der Physik **219**, 272-282 (1871)
78. Z. Heiner, and K. Osvay, eds. *A kvantumoptika és -elektronika legújabb eredményei* (Szegedi Tudományegyetem, Szeged, 2006).
79. A.Baltuska, M.Uiberacker, E.Goulielmakis, R.Kienberger, V.Yakovlev, Th.Udem, T.Hänsch, and F.Krausz, "*Phase controlled amplification of few-cycle laser pulses*" IEEE J. Sel. Topics Quantum Electron. **9**, 972-989 (2003)
80. D. J. Jones, S. A. Diddams, J. K. Ranka, A. Stentz, R. S. Windeler, J. L. Hall, and S. T. Cundiff, "*Carrier-Envelope Phase Control of Femtosecond Mode-Locked Lasers and Direct Optical Frequency Synthesis*" Science **288**, 635-639 (2000)
81. R. K. Shelton, L.-S. Ma, H. C. Kapteyn, M. M. Murnane, J. L. Hall, and J. Ye, "*Phase-Coherent Optical Pulse Synthesis from Separate Femtosecond Lasers*" Science **293**, 1286-1289 (2001)
82. Hámori András, and N. Nagy, "Integrált optikai szenzorok," (<ftp://alag3.mfa.kfki.hu/PUB/Optics/Optikai%20szenzorok.pdf>, Budapest).
83. P.K. Tien, "*Integrated optics and new wave phenomena in optical waveguides*" Reviews of Modern Physics **49**, 361-420 (1977)
84. B. Liedberg, C. Nylander, and I. Lunström, "*Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing*" Sensors and Actuators **4**, 299-304 (1983)
85. N. L. Thompson, T. P. Burghardt, and D. Axelrod, "*Measuring surface dynamics of biomolecules by total internal reflection fluorescence with photobleaching recovery or correlation spectroscopy*" Biophysical Journal **33**, 435-454 (1981)
86. N. J. Harrick, *Internal reflection spectroscopy* (Harrick Scientific Corp., Ossining, N.Y., 1967).
87. R. W. Watkins, and C. R. Robertson, "*A total internal-reflection technique for the examination of protein adsorption*" Journal of Biomedical Materials Research **11**, 915-938 (1977)
88. M. Born, and E. Wolf, *Principles of Optics* (Pergamon, London, 1959).
89. M. V. Klein, and T. E. Furtak, *Optik* (Springer-Verlag, Berlin, 1984).

90. J. J. Ramsden, *"Review of new experimental techniques for investigating random sequential adsorption"* Journal of Statistical Physics **73**, 853-877 (1993)
91. K. Tiefenthaler, and W. Lukosz, "Optical sensor for selective detection of substances and/or for the detection of refractive index changes in gaseous, liquid, solid and porous samples," in *United States Patent*(Oerlikon-Buhrle Holding AG, Zurich, Switzerland, 1989).
92. H. P. Braun, *"Wave-guide spectroscopy of biological material"* Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie **93**, 358-364 (1989)
93. K. Tiefenthaler, and W. Lukosz, *"Sensitivity of grating couplers as integrated-optical chemical sensors"* J. Opt. Soc. Am. B **6**, 209-220 (1989)
94. S. Damjanovich, J. Fidy, and J. Szöllösi, *Orvosi Biofizika* (Medicina, Budapest, 2006).
95. Ian D. Johnson, and M. W. Davidson,
"http://www.olympusmicro.com/primer/java/jablonski/jabintro/index.html."
96. J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy Third Edition* (Springer, Baltimore, 2006).
97. W. Becker, *Advanced Time-Correlated Single Photon Counting Techniques* (Springer, Heidelberg, 2005).
98. David Birch, and R. Imhof, "Time-Domain Fluorescence Spectroscopy Using Time-Correlated Single-Photon Counting," in *Topics in Fluorescence Spectroscopy*, J. R. Lakowicz, ed. (Kluwer Academic Publishers, Boston, 2002), pp. 1-95.
99. N. H. Schiller, "Picosecond streak camera photonics," in *Semiconductors probed by ultrafast laser spectroscopy*(Academic Press, New York, 1984), pp. 441–458.
100. W. Becker, *The bH TCSPC Handbook 4th Edition* (Becker & Hickl GmbH, Berlin, 2010).
101. M. A. Duguay, *"The ultrafast optical Kerr shutter"* Progress in Optics **14**, 161-193 (1976)
102. B. Schmidt, S. Laimgruber, W. Zinth, and P. Gilch, *"A broadband Kerr shutter for femtosecond fluorescence spectroscopy"* Applied Physics B: Lasers & Optics **76**, 809-814 (2003)
103. M. A. Kahlöw, W. Jarzeba, T. P. DuBruil, and P. F. Barbara, *"Ultrafast emission spectroscopy in the ultraviolet by time-gated upconversion"* Review of Scientific Instruments **59**, 1098-1109 (1988)

104. G. C. Walker, W. Jarzeba, T. J. Kang, A. E. Johnson, and P. F. Barbara, "*Ultraviolet femtosecond fluorescence spectroscopy: techniques and applications*" J. Opt. Soc. Am. B **7**, 1521-1527 (1990)
105. "<http://www.univie.ac.at/ultrafast-dynamics/newgraphix/uc1.jpg>."
106. V. G. Dimitriev, G. G. Gurzadyan, and D. N. Nikogosyan, *Handbook of Nonlinear Optical Crystals 3rd Edition* (Springer, Berlin, 1999).
107. M. Nakata, and M. Sakurai, "*Refractive index and excess volume for binary liquid mixtures. Part 1.-Analyses of new and old data for binary mixtures*" Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases **83**, 2449-2457 (1987)
108. M. Friebe, and M. Meinke, "*Model function to calculate the refractive index of native hemoglobin in the wavelength range of 250–1100nm dependent on concentration*" Applied Optics **45**, 2838–2842 (2006)
109. L. E. Nielsen, *Predicting the Properties of Mixture: mixture rules in science and engineering* (M. Dekker, 1978).
110. C. Gergely, L. Zimányi, and G. Váró, "*Bacteriorhodopsin Intermediate Spectra Determined over a Wide pH Range*" The Journal of Physical Chemistry B **101**, 9390-9395 (1997)
111. D. Tentori, and J. R. Lerma, "*Refractometry by minimum deviation: accuracy analysis*" Opt. Eng. **29**, 160–168 (1990)
112. E. Korchemskaya, D. Stepanchikov, and T. Dyukova, "*Photoinduced anisotropy in chemically-modified films of bacteriorhodopsin and its genetic mutants*" Opt. Mater. **14**, 185–191 (2000)
113. G. Chen, Y. Yuan, C. Zhang, G. Yang, J. G. Tian, T. Xu, and Q. W. Song, "*All-optical time-delay relay based on a bacteriorhodopsin film*" Opt. Lett. **31**, 1531–1533 (2006)
114. M. Mero, A. Sipos, G. Kurdi, and K. Osvay, "*Generation of energetic femtosecond green pulses based on an OPCPA-SFG scheme*" Opt. Express **19**, 9646-9655
115. "<http://www.sandia.gov/pcnsc/departments/lasers/snlo-software.html>," (Sandia National Laboratories, 2005).
116. J. T. Verdeyen, *Laser Electronics (3rd Edition)* (Prentice-Hall, 1995).
117. H. Rhee, and T. Joo, "*Noncollinear phase matching in fluorescence upconversion*" Opt. Lett. **30**, 96-98 (2005)
118. Jean-Claude Diels, and W. Rudolph, *Ultrashort Laser Pulse Phenomena 2nd Edition* (Academic Press, Boston, 2006).

119. "<http://mathworld.wolfram.com/SingularValueDecomposition.html>," (Wolfram MathWorld).
120. Z. Heiner, A. Makai, and G. I. Groma, "Ultrafast fluorescence kinetics measurement based on up-conversion method," (COST Meeting & Training School, Nonlinear Nanophotonics 2010, Visegrád, Hungary).
121. A. Mokhtari, A. Chebira, and J. Chesnoy, "*Subpicosecond fluorescence dynamics of dye molecules*" J. Opt. Soc. Am. B **7**, 1551-1557 (1990)
122. M. Yoshizawa, K. Suzuki, A. Kubo, and S. Saikan, "*Femtosecond study of S2 fluorescence in malachite green in solutions*" Chemical Physics Letters **290**, 43-48 (1998)
123. Y. Kanematsu, H. Ozawa, I. Tanaka, and S. Kinoshita, "*Femtosecond optical Kerr-gate measurement of fluorescence spectra of dye solutions*" Journal of Luminescence **87-89**, 917-919 (2000)
124. A. C. Bhasikuttan, A. V. Sapre, and T. Okada, "*Ultrafast Relaxation Dynamics from the S2 State of Malachite Green Studied with Femtosecond Upconversion Spectroscopy*" J. Phys. Chem. A **107**, 3030-3035 (2003)
125. K. Dobek, "*The Influence of Temperature on Coumarin 153 Fluorescence Kinetics*" Journal of Fluorescence **21**, 1547-1557 (2011)
126. U. Brackmann, *Laser Dyes* (Lambda Physik AG, Göttingen, Germany, 2000).
127. G. Landl, T. Langthaler, H. W. Engl, and H. F. Kauffmann, "*Distribution of event times in time-resolved fluorescence: The exponential series approach-algorithm, regularization, analysis*" Journal of Computational Physics **95**, 1-28 (1991)
128. J. T. Giurleo, and D. S. Talaga, "*Global fitting without a global model: Regularization based on the continuity of the evolution of parameter distributions*" The Journal of Chemical Physics **128**, 114114-114118 (2008)
129. G. I. Groma, Z. Heiner, A. Makai, and F. Sarlos, "*Estimation of kinetic parameters from time-resolved fluorescence data: A compressed sensing approach*" RSC Advances **2**, 11481-11490 (2012)
130. Y. S. Liu, and W. R. Ware, "*Photophysics of polycyclic aromatic hydrocarbons adsorbed on silica gel surfaces. 1. Fluorescence lifetime distribution analysis: an ill-conditioned problem*" The Journal of Physical Chemistry **97**, 5980-5986 (1993)
131. E. J. Candes, and M. B. Wakin, "*An Introduction To Compressive Sampling*" IEEE Signal Process. Mag. **25**, 21-30 (2008)

132. D. L. Donoho, and J. Tanner, *"Sparse nonnegative solution of underdetermined linear equations by linear programming"* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**, 9446-9451 (2005)
133. S. Chen, D. Donoho, and M. Saunders, *"Atomic decomposition by basis pursuit"* SIAM Review J. Sci. Comput. **20**, 33–61. (1999)
134. "<http://dsp.rice.edu/cs>."
135. L. Rover Jr, J. C. B. Fernandes, G. de Oliveira Neto, L. T. Kubota, E. Katekawa, and S. H. P. Serrano, *"Study of NADH Stability Using Ultraviolet-Visible Spectrophotometric Analysis and Factorial Design"* Analytical Biochemistry **260**, 50-55 (1998)
136. "<http://refractiveindex.info/>."
137. M. Daimon, and A. Masumura, *"High-Accuracy Measurements of the Refractive Index and its Temperature Coefficient of Calcium Fluoride in a Wide Wavelength Range from 138 to 2326 nm"* Appl. Opt. **41**, 5275-5281 (2002)
138. I. H. Malitson, *"A Redetermination of Some Optical Properties of Calcium Fluoride"* Appl. Opt. **2**, 1103-1107 (1963)
139. M. Lorenc, M. Ziolk, R. Naskrecki, J. Karolczak, J. Kubicki, and A. Maciejewski, *"Artifacts in femtosecond transient absorption spectroscopy"* Appl. Phys. B **74**, 19-27 (2002)
140. A. Börzsönyi, Z. Heiner, M. P. Kalashnikov, A. P. Kovács, and K. Osvay, *"Dispersion measurement of inert gases and gas mixtures at 800 nm"* Appl. Opt. **47**, 4856-4863 (2008)
141. M. Daimon, and A. Masumura, *"Measurement of the refractive index of distilled water from the near-infrared region to the ultraviolet region"* Appl. Opt. **46**, 3811-3820 (2007)
142. I. Z. Kozma, P. Krok, and E. Riedle, *"Direct measurement of the group-velocity mismatch and derivation of the refractive-index dispersion for a variety of solvents in the ultraviolet"* J. Opt. Soc. Am. B **22**, 1479-1485 (2005)
143. C. Zhang, Q. W. Song, C.-Y. Ku, R. B. Gross, and R. R. Birge, *"Determination of the refractive index of a bacteriorhodopsin film"* Opt. Lett. **19**, 1409-1411 (1994)
144. Z. Heiner, and K. Osvay, *"Refractive index of dark-adapted bacteriorhodopsin and tris(hydroxymethyl)aminomethane buffer between 390 and 880 nm"* Appl. Opt. **48**, 4610-4615 (2009)
145. L. Fábíán, Z. Heiner, M. Mero, M. Kiss, E. K. Wolff, P. Ormos, K. Osvay, and A. Dér, *"Protein-based ultrafast photonic switching"* Opt. Express **19**, 18861-18870 (2012)

146. R. A. Mathies, C. H. Brito Cruz, W. T. Pollard, and C. V. Shank, "*Direct observation of the femtosecond excited-state cis-trans isomerization in bacteriorhodopsin*" *Science* **240**, 777-779 (1988)
147. S. Ruhman, B. X. Hou, N. Friedman, M. Ottolenghi, and M. Sheves, "*Following evolution of bacteriorhodopsin in its reactive excited state via stimulated emission pumping*" *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 8854-8858 (2002)
148. S. Sharkov, A. Pakulev, S. Chekalin, and Y. Matveetz, "*Primary events in bacteriorhodopsin probed by subpicosecond spectroscopy*" *Biochim. Biophys. Acta* **808**, 94-102 (1985)
149. A. Aharoni, B. Hou, N. Friedman, M. Ottolenghi, I. Rouso, S. Ruhman, M. Sheves, T. Ye, and Q. Zhong, "*Non-isomerizable artificial pigments: Implications for the primary light-induced events in bacteriorhodopsin*" *Biochemistry-Moscow* **66**, 1210-1219 (2001)
150. A. Biesso, W. Qian, and M. El-Sayed, "*Gold nanoparticle plasmonic field effect on the primary step of the other photosynthetic system in Nature, bacteriorhodopsin*" *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 3258-3259 (2008)
151. D. W. McCamant, P. Kurkura, and R. A. Mathies, "*Femtosecond stimulated Raman study of excited-state evolution in bacteriorhodopsin*" *J. Phys. Chem. B* **109**, 10449-10457 (2005)
152. J. Dobler, W. Zinth, W. Kaiser, and D. Oesterhelt, "*Excited-state reaction dynamics of bacteriorhodopsin studied by femtosecond spectroscopy*" *Chem. Phys. Letters* **144**, 215-220 (1988)
153. M. L. Applebury, K. S. Peters, and P. M. Rentzepis, "*Primary intermediates in the photochemical cycle of bacteriorhodopsin*" *Biophysical Journal* **23**, 375-382 (1978)
154. G. Li, and K. D. Glusac, "*The Role of Adenine in Fast Excited-State Deactivation of FAD: a Femtosecond Mid-IR Transient Absorption Study*" *The Journal of Physical Chemistry B* **113**, 9059-9061 (2009)
155. Haik Chosrowjan, Seiji Taniguchi, Noboru Mataga, Fumio Tanaka, and A. J. W. G. Visser, "*The stacked flavin adenine dinucleotide conformation in water is fluorescent on picosecond timescale*" *Chemical Physics Letters* **378**, 354-358 (2003)
156. S. D. M. Islam, T. Susdorf, A. Penzkofer, and P. Hegemann, "*Fluorescence quenching of flavin adenine dinucleotide in aqueous solution by pH dependent isomerisation and photo-induced electron transfer*" *Chemical Physics* **295**, 137-149 (2003)

157. G. Kotowycz, N. Teng, M. P. Klein, and M. Calvin, "*The 220 MHz nuclear magnetic resonance study of a solvent-induced conformational change in flavin adenine dinucleotide*" *Journal of Biological Chemistry* **244**, 5656-5662 (1969)
158. Z. W. Chen, M. Koh, G. Van Driessche, J. J. Van Beeumen, R. G. Bartsch, T. E. Meyer, M. A. Cusanovich, and F. S. Mathews, "*The structure of flavocytochrome c sulfide dehydrogenase from a purple phototrophic bacterium*" *Science* **266**, 430-432 (1994)
159. I. H. M. van Stokkum, D. S. Larsen, and R. van Grondelle, "*Erratum to "Global and target analysis of time-resolved spectra"*" " *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1658**, 262 (2004)
160. J. R. Knutson, D. G. Walbridge, and L. Brand, "*Decay-associated fluorescence spectra and the heterogeneous emission of alcohol dehydrogenase*" *Biochemistry* **21**, 4671-4679 (1982)
161. D. Zhong, S. K. Pal, D. Zhang, S. I. Chan, and A. H. Zewail, "*Femtosecond dynamics of rubredoxin: Tryptophan solvation and resonance energy transfer in the protein*" *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 13-18 (2002)
162. R. Jimenez, G. R. Fleming, P. V. Kumar, and M. Maroncelli, "*Femtosecond solvation dynamics of water*" *Nature* **369**, 471-473 (1994)
163. P. A. W. van den Berg, K. A. Feenstra, A. E. Mark, H. J. C. Berendsen, and A. J. W. G. Visser, "*Dynamic Conformations of Flavin Adenine Dinucleotide: Simulated Molecular Dynamics of the Flavin Cofactor Related to the Time-Resolved Fluorescence Characteristics*" *J. Phys. Chem. B* **106**, 8858–8869 (2002)