

PhD értekezés tézisei

**“INTEGRATED OPTICAL APPLICATIONS OF
BACTERIORHODOPSIN”**

FÁBIÁN LÁSZLÓ

Témavezető: **DR. DÉR ANDRÁS**
tudományos tanácsadó



MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA
SZEGEDI BIOLÓGIAI KUTATÓKÖZPONT
BIOFIZIKAI INTÉZET

Szeged, 2012

A tézispontokhoz kapcsolódó, referált nemzetközi folyóiratokban megjelent publikációk, könyvfejezetek:

1. P. Ormos, L. Fábán, L. Oroszi, E. K. Wolff, J. J. Ramsden, A. Dér,
Protein-based integrated optical switching and modulation.
Appl. Phys. Lett. **80**, 4060 (2002).
2. L. Fábán, L. Oroszi, P. Ormos, A. Dér,
Optical Waveguide Lightmode Spectroscopy and biocomputing.
In: Molecular electronics: Bio-sensors and bio-computers, L. Barsanti, et al.
(eds.),
Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands, p. 341 (2003).
3. A. Dér, S. Valkai, L. Fábán, P. Ormos, J.J. Ramsden, E. K. Wolff,
Integrated optical switching based on the protein bacteriorhodopsin.
Photochem. Photobiol. **83**, 393 (2007).
4. L. Fábán, E. K. Wolff, L. Oroszi, P. Ormos, A. Dér,
Fast integrated optical switching by the protein bacteriorhodopsin.
Appl. Phys. Lett. **97**, 023305 (2010).
5. L. Fábán, Z. Heiner, M. Mero, M. Kiss, E. K. Wolff, P. Ormos, K. Osvay,
A. Dér,
Protein-based ultrafast photonic switching.
Opt. Expr. **19**, 18861 (2011).*

* A szóban forgó publikáció szubpikoszekundumos kapcsolásra vonatkozó eredményei közös megegyezés alapján Heiner Zsuzsannát illetik, azokat PhD disszertációjában sajátjaként felhasználhatja.

A tézispontokhoz nem kapcsolódó, referált nemzetközi folyóiratokban megjelent publikációk:

6. A. Dér, L. Kelemen, L. Fábián, S. G. Taneva, E. Fodor, T. Páli, A. Cupane, M. G. Cacace, J. J. Ramsden,
Interfacial water structure controls protein conformation.
J. Phys. Chem. B **111**, 5344 (2007).
7. R. Tóth-Boconádi, S. G. Taneva, L. Fábián, A. Dér, L. Keszthelyi,
pH-dependence of the photoelectric response of the M intermediate of bacteriorhodopsin.
J. Biol. Phys. Chem. **7**, 147 (2007).
8. R. Tóth-Boconádi, A. Dér, L. Fábián, S. G. Taneva, L. Keszthelyi,
Excitation of the M intermediates of bacteriorhodopsin.
Photochem. Photobiol. **85**, 609 (2009).

1. Bevezetés

1965-ben Gordon E. Moore, a Fairchild Semiconductor kutatási és fejlesztési részlegének akkori igazgatója, az 1958-65-ig rendelkezésre álló adatok alapján kimutatta, hogy az egységnyi területű hordozóra integrált elektronikai komponensek száma évente megduplázódik, majd 1975-ben ezt a növekedési arányt kétévenkéntire módosította. Ez a Moore-törvényként ismert extrapoláció ugyan korlátozott mértékben, de napjainkban is érvényes.

Bár a Moore-törvény által jósolt exponenciális növekedés még ma is tart, a miniatürizálás kb. 2025-re eléri azt a szintet, hogy az integrált elektronikai elemek mérete nem csökkenthető tovább. A mai csúcstechnológiával készülő mikroprocesszorokban alkalmazott 20-30 nm-es vezetővastagságot 2015-re 10 nm-re szeretnék csökkenteni, ami a felmerülő problémák (elektromágneses interferencia, hődisszipáció) miatt a miniatürizálás utolsó állomását jelentheti. Bár a hétköznapi használatban levő eszközökben továbbra is egyeduralkodó szerepet tölt be a mikroelektronika, egyre több olyan új tudományterület fejlődik ki, melyek célja az elektronikai eszközök részleges vagy teljes kiváltása más, gazdaságosabb, gyorsabb működést biztosító komponensekkel.

Az egyik ilyen ígéretes, fiatal interdiszciplináris tudományág az integrált optika, melynek célja, hogy a meglévő technológiák segítségével a mikroelektronikai áramkörökhöz hasonlóan, aktív és passzív optikai elemeket tartalmazó optikai "áramköröket" egyetlen szubsztrátra integráljon. A tudományterület technológiai háttere adott, az elektronikai áramkörök passzív és aktív elemeinek megfelelő mikron méretű optikai hullámvezetők ill. optikai kapcsolók kialakítása könnyedén megvalósítható üveg, polimer, illetve műanyag hordozókon is.

Az jelenleg folyó kutatások célja olyan, megfelelő nemlineáris optikai (NLO) tulajdonságokkal rendelkező anyagok keresése, amelyek aktív szerepet tölthetnek be az integrált optikai készülékek vezérlésében. Az NLO anyagokkal szemben támasztott követelmények többek közt a nagy, fényindukált törésmutató-változás, mechanikai stabilitás, többszöri újragrjeszthetőség. A hagyományos, szerves és szervesetlen kristályokon kívül újabban biológiai molekulák alkalmazhatóságát is vizsgálják.

Technikai alkalmazások terén általában elhanyagolják a biológiai molekulákat, hiszen legtöbbjük nagyon érzékeny a környezeti változásokra, gyorsan tönkremennek, elveszítik biológiai funkciójukat. Egy ígéretes kivétel ez alól a *bakteriorodopszin*

nevű fehérje (*bR*), amely mind gélbe ágyazva, mind pedig felületre szárított formában hosszú ideig megőrzi aktivitását. Többek közt ennek a robusztus felépítésnek köszönhető, hogy több kutatócsoport is nagy érdeklődéssel fordult a molekula kiváló nemlineáris optikai tulajdonságai, pl. a fényindukált törésmutató-változás technikai felhasználása felé.

A bakteriorodopszin a *Halobacterium salinarum* sótűrő baktérium külső sejtmembránjában található fényérzékeny membránfehérje. A fehérje trimerek a sejt felületén nagyobb kiterjedésű foltokat alkotva, szabályos hatszöges kristályrácsban helyezkednek el. A membrán ezen területeit a fehérjétől származó jellegzetes színük miatt *bíbormembránnak* nevezték el. *In vivo* körülmények közt a fehérje alapvető feladata a membránon keresztüli protontranszport, amely a sejt energiatermelésének egyik fontos lépése. Fény hatására a fehérje protont pumpál a citoplazmikus térből a membránon kívüli térrészbe, az így kialakuló elektrokémiai gradienst a szintén a membránban található ATP-áz a sejt energiaforrását biztosító ATP molekula szintézisére használja fel. A bakteriorodopszin egyike a jelenleg ismert legegyszerűbb és legjobban karakterizált aktív iontranszportáló fehérjéknek, ezáltal jelentős szerepet kap a komplex molekuláris pumpák működésének atomi szintű tanulmányozásában is.

A bakteriorodopszinban található fényérzékeny molekula egy – a 216-os számú lizin oldallánchoz protonált Schiff-bázison keresztül kovalensen kötött – alapállapotban *all-trans* konfigurációjú retinál molekula. Egy megfelelő energiájú foton elnyelése során a retinál izomerizálódik (*13-cis retinál*), majd deprotonálódik. A Schiff-bázisról lekerülő protont a fehérje különböző oldalláncokon keresztül a sejten kívüli térrészbe szállítja, majd a retinál a citoplazma felől reprotonálódik és a fehérje újra alapállapotba kerül. A gerjesztés és a fehérje relaxációja közti folyamatok összességét nevezzük *fotociklusnak*.

A proton transzlokációja során a fehérje különböző, spektroszkópiai módszerekkel jól megkülönböztethető konformációs állapotokon megy keresztül. Ezen *intermedier* állapotok jelölése rendre: BR₅₆₈, J₆₂₅, K₆₁₀, L₅₄₀, M₄₁₂, N₅₅₀, O₆₃₀, ahol az alsó indexek az egyes intermedierek abszorpciós maximumát jelölik (nm-ben). Az fotociklus kései (K, L, M,...) intermedier állapotai maguk is fényérzékenyek, a fotociklus egy további gerjesztőfény alkalmazásával “rövidre zárható”, ha annak hullámhossza az adott intermedier abszorpciós maximumának közelében van. Ebben az esetben az adott intermedier után következő állapotok nem alakulnak ki, a fehérje visszatér alapállapotba.

A fotociklus közben az abszorpciós spektrum eltolódása a Kramers-Kronig összefüggések alapján a törésmutató megváltozását eredményezi, ami egyike az integrált áramkörökben aktív szerepet betöltendő anyagokkal szemben támasztott követelményeknek. A különböző módszerekkel mért törésmutató-változás nagysága összemérhető, egyes esetekben meg is haladja a jelenleg aktív optikai anyagként használatos szerves kristályok által produkált értékeket, ami a fehérje egyéb jó tulajdonságait figyelembe véve újabb érv az integrált optikában való felhasználása mellett.

Hullámvezető-alapú integrált optikai eszközökben a vezető rétegben haladó fény terjedési tulajdonságait nagyban befolyásolja a hullámvezető réteg két határfelületén található anyagok (*szubsztrát, ill. adlayer*) törésmutatója. Az adlayer törésmutatójának változása hatással van a vezetett módus terjedésére, melynek következtében a vezető rétegben haladó fény intenzitása, ill. adott esetben a spektruma is megváltozik.

A hullámvezetők fenti tulajdonsága, valamint a bakteriorodopszin fényindukált törésmutató-változásának kombinációja lehetőséget teremt egy fehérje alapú, teljesen optikai elven működő integrált fénykapcsoló, ill. -modulátor megvalósítására. A megfelelően gyors és stabil működésű integrált biofotonikus kapcsoló kedvező tulajdonságait – alacsony előállítási költség, nagy fényindukált törésmutató, gyakorlatilag végtelen sokszori újragérezhetőség – figyelembe véve, az komoly vetélytársa lehet az integrált optikában jelenleg használatos akusztó- és elektrooptikai kapcsolóknak.

2. Célkitűzések

Munkám során a bakteriorodopszin fotociklusa során fellépő fényindukált törésmutató-változásának, valamint a jelenség hullámvezető-alapú integrált optikai eszközökben való felhasználásának vizsgálatát tűztem ki célul. Kísérleteim célja volt, hogy a fehérje kedvező nemlineáris optikai tulajdonságait kiaknázva olyan, teljesen optikai elven működő integrált optikai fénykapcsoló elvét demonstráljam, amely az adott célra megfelelően optimalizálva komoly konkurens lehet a jelenleg alkalmazott megoldásoknak. Az egyes kísérletek céljai a következők voltak:

- 1) A bakteriorodopszinban impulzus gerjesztés hatására kialakuló $BR \rightarrow M$ és $M \rightarrow BR$ átmenetekhez tartozó törésmutató-változás mérése az OWLS-technika

segítségével; a bR-rel, mint aktív optikai anyaggal kombinált rácsos csatolású sík hullámvezető, mint fehérje alapú, integrált optikai fényvezérelt fénykapcsoló lehetséges felhasználásának vizsgálata.

- 2) Aktív optikai anyagként bakteriorodopszin alkalmazó, folytonos gerjesztéssel megvalósított, interferometrikus alapon működő integrált optikai intenzitás-modulátor megvalósítása és vizsgálata.
- 3) A bakteriorodopszin réteggel bevont Mach-Zehnder interferométer, mint integrált optikai fénykapcsoló és modulátor kísérleti demonstrációja a BR → K átmenetet követő törésmutató-változás felhasználásával nanoszekundumos mérő- és gerjesztő impulzusok alkalmazása esetén.
- 4) A BR → K átmenettel járó, pikoszekundumos időskálán lejátszódó, ultragyors törésmutató-változás kiaknázása hullámvezető alapú integrált optikai hullámhossz- és amplitúdó-modulációra, pikoszekundumos gerjesztés mellett.

3. Anyagok és módszerek

Az általam végzett kísérletek többségében az integrált optikai eszközök passzív eleme egy rácsos csatolású sík hullámvezető volt. A hullámvezető egy 48×16 mm-es üveg szubsztrátra (BK7, $n_s=1.515$, 632.8 nm-en) párologtatott vékony, nagy törésmutatójú ($d\approx 200$ nm, $n_F\approx 1.8$, 632.8 nm-en) dielektrikum réteg (a tulajdonképpeni hullámvezető réteg). A hullámvezető közepén keresztirányban egy kb. 1 mm széles, 2400 vonal/mm-es optikai rácsot alakítottak ki. Az optikai rács paramétereit biztosítják, hogy a hullámvezető rétegbe csak az első rendben elhajlított sugarakat tudjuk becsatolni.

Néhány kísérletben intézetünkben fotopolimerizációs eljárással készült Mach-Zehnder interferométert használtam. Az eszköz alapja üveg hordozóra centrifugális rétegezéssel (*spin coating*) felvitt fényre szilárduló anyag. Az interferométer struktúra kialakítása a réteg intenzív lézerfényvel való megvilágításával történt. A folyamat végén – a réteg lézerrel nem kezelt részeit lemosva – a szubsztráton egy kb. 9 μm átmérőjű fényvezető struktúrából álló interferométert kapunk. Az integrált interferométer be- és kimenetére a könnyebb becsatolás érdekében egy-egy optikai szálat rögzítettünk.

A vizsgált integrált optikai eszközök aktív anyagát minden esetben a passzív struktúrák felületére szárított, kb. 1 μm vastagságú, bakteriorodopszin-tartalmú

bíbormembrán fragmentekből álló réteg alkotta. Az aktív réteg a sík hullámvezető esetén az optikai rács felett, a Mach-Zehnder interferométer esetén az interferométer egyik, vagy adott esetben mindkét karján helyezkedett el. A fehérjét tartalmazó aktív réteget tömény, kb. 30-40-es OD-jű bíbormembrán darabkákat tartalmazó oldatcsepp felületre szárításával kaptuk.

A hullámvezető struktúrákba csatolt, valamint a bakteriorodopszin gerjesztésére szolgáló lézerefényt többfajta forrás szolgáltatta. Kísérleteim során folytonos üzemű (*CW, continuous wave*) mérőfényként He-Ne (5 mW, 632.8 nm), valamint Ar⁺ és Kr⁺ lézerek különböző hullámhosszúságú nyalábját használtam. Impulzus üzemű mérő-, illetve gerjesztőfényként egy Nd:YAG lézer másodharmonikusa (532 nm), valamint harmadik harmonikusával (355 nm) pumpált, 400-700 nm-ig hangolható optikai parametrikus oszcillátor (*OPO*) 3-5 ns időtartamú impulzusai szolgáltak. A pikoszekundumos gerjesztő és mérőimpulzusokat a Szegedi Tudományegyetem Optikai és Kvantumelektronikai Tanszékén található TeWaTi lézerrendszer szinkronizált nyalábjai biztosították. A hullámvezetőből kicsatolt fény intenzitását az adott kísérlettől függően fotoelektron-sokszorozó, fotodióda vagy spektrométer segítségével detektáltuk, majd egy digitális tároló oszcilloszkóp segítségével dolgoztuk fel.

A bakteriorodopszin fotociklusa során fellépő törésmutató-változások mérése az OWLS-technika alapján történt, a numerikus számolásokhoz a 3-rétegű sík hullámvezető elméletét használtam.

4. Eredmények

Tudományos eredményeimet a következő pontokban foglalom össze:

1. Az OWLS-technika alkalmazásával, sík hullámvezető, mint passzív integrált optikai elem felhasználásával megmértem a szárított bakteriorodopszin minta törésmutatóját, valamint a fehérje BR → M átmenetének fényindukált törésmutató-változását. A gerjesztetlen minta esetén kapott $n=1.52$ -es törésmutató jó egyezést mutat a korábban, más módszerek segítségével meghatározott értékkel.

Az impulzus-gerjesztést követően mért intenzitás-változások és abszorpció-kinetikai mérések összehasonlításával kimutattam, hogy az előbbi időbeli változása megegyezik az M forma kialakulásával. Ez az eredmény az intenzitás-változás

okaként egyértelműen a BR → M átmenet közbeni, az abszorpciós spektrum mintegy 160 nm-es eltolódásából származó törésmutató-változást jelöli meg. A BR → M átmenetet követő $\Delta n = 2 \times 10^{-3}$ törésmutató-változás mintegy 70%-os csökkenést okozott a becsatolt fény intenzitásában. Impulzus-gerjesztés esetén a becsatolt fény intenzitás-változásának, azaz az optikai kapcsolás sebességének határt szab az M forma felhalmozódásához szükséges idő, ami vad típusú bR esetén kb. 50 μ s.

Az előbbinél jóval gyorsabb, szubmikroszekundumos kapcsolást valósítottam meg az M → BR fényindukált reakció felhasználásával, nevezetesen, az alapállapotú minta folytonos fényvel való megvilágításakor felhalmozódó M formának kék fényvel történő, alapállapotba való “visszagerjesztésével”. Ebben az esetben a kapcsolás sebessége mikroszekundumnál gyorsabb, azonban a kapcsolások frekvenciáját limitálja az M forma kialakulásának sebessége, ami esetünkben a folytonos gerjesztés miatt kb. 15 ms volt.

2. Integrált optikai Mach-Zehnder interferométer és bakteriorodopszin együttes alkalmazásával, folytonosan változó intenzitású gerjesztőfényt használva demonstráltam a fényvezérelt fénymoduláció elvét. Az interferométer karjára szárított bR minta – mint aktív NLO anyag – törésmutató-változása modulálja a karokban terjedő vezetett módusok relatív fázisát, megváltoztatva ezáltal a kimeneten mérhető intenzitást. A folytonos gerjesztő teljesítményt a 10-100 mW tartományon növelve az interferométer kimenetén mérhető intenzitás szinuszos változása figyelhető meg. A száraz minta fotociklusa, valamint az egyes intermedierek spektrális tulajdonságainak figyelembevételével megállapítottam, hogy a minta törésmutatójának kialakításában a K és M formák koncentráció-aránya játszik szerepet. Alacsony gerjesztő intenzitás mellett az M, míg nagy intenzitás esetén a K forma halmozódik fel, különböző irányba tolva el a minta törésmutatóját. Számításaim alapján a BR → K átmenethez tartozó törésmutató-változás megközelítőleg 9×10^{-4} , és ellentétes előjelű a BR → M átmenet esetén mérhető változással.

3. Az előző kísérlet eredményeit felhasználva megvalósítottam egy bakteriorodopszin-alapú, interferometrikus elven működő nanoszekundumos optikai kapcsolót. Együttesen alkalmazott nanoszekundumos mérő-, ill. gerjesztő-impulzus esetén a száraz bakteriorodopszin mintában a K intermedier koncentrációja a

domináns, mivel a későbbi (L és M) intermedierek mikroszekundumos időállandóval alakulnak ki. Emiatt az interferométerben terjedő impulzus intenzitás-változása a BR → K átmenethez tartozó törésmutató-változás eredménye. Méréseim során – az interferométer munkapontjának megfelelő beállításával – a mérőimpulzus intenzitásának mintegy 50%-os modulációját sikerült elérnem. Megállapítottam, hogy még a fehérje BR → K átmenetével együtt járó, aránylag kis törésmutató-változás is elegendő lehet optikai kapcsolás megvalósításához.

4. A K forma kialakulásának pikoszekundumos nagyságrendje lehetőséget ad ultragyors integrált optikai kapcsolás megvalósítására is. Az ultragyors kapcsolás demonstrálására pikoszekundumos pumpa-próba technikát alkalmaztam. A szinkronizált gerjesztő (*pumpa*, $\lambda=530\text{ nm}$, $\tau=45\text{ ps}$) és mérőimpulzusok (*próba*, $\lambda=790\text{ nm}$, $\tau=12\text{ ps}$) egymáshoz képest 100 ps időeltolódással érték a mintát.

Kimutattam, hogy ha a próbaimpulzus spektrális szélességéből adódó effektív becsatolási szögtartomány nagyobb, mint a becsatolási szögnek a bR réteg törésmutató-változásából adódó eltolódása, akkor gerjesztés hatására a mérőfény intenzitás-változás helyett spektrális eltolódást szenved. Szélessávú (*esetünkben* $\Delta\lambda=3\text{ nm}$) próbaimpulzus használata esetén tehát a hullámvezető hullámhossz-szelektivitása lehetőséget ad integrált optikai frekvencia-demultiplexer megvalósítására.

Keskenysávú próbaimpulzus alkalmazása esetén a sík hullámvezető szög-szelektivitása miatt az adlayer törésmutató-változása, a már megismert módon, a hullámvezetőben terjedő próbaimpulzus intenzitás-változását okozza. A próba spektrális sáv szélességét $\Delta\lambda=0.8\text{ nm}$ -re csökkentve, az aktív bR-réteg gerjesztésével a sík hullámvezetőben terjedő próbaimpulzus mintegy 50%-os intenzitás-változását sikerült kimutatnom, pikoszekundumos időskálán.

Összefoglalás

A bakteriorodopszin fotociklusának BR → M és BR → K átmenetei során fellépő fényindukált törésmutató-változásokat kihasználva példákat mutattam néhány integrált optikai alkalmazásra. A fenti eredmények igazolják a bakteriorodopszin, mint aktív NLO anyag, hullámvezető-alapú integrált optikai eszközökben való alkalmazhatóságát.

Köszönetnyilvánítás

Bár a disszertáció fedőlapján egyedül az én nevem szerepel, ez a munka nem valósulhatott volna meg a rengeteg támogatás nélkül, amit munkatársaimtól, barátaimtól kaptam.

Köszönet illeti elsősorban Dr. Dér Andrást, témavezetőmet, a Biofizikai Intézet igazgató-helyettesét, akitől az évek során szakmailag és emberileg is a legtöbbet tanultam. Szakmai tudása és jelleme követendő példa számomra, optimizmusa, tudományos elhivatottsága és kritikus szemléletmódja mindvégig motiválóan hatottak rám.

Köszönöm Dr. Ormos Pál akadémikus, a Biofizikai Intézet igazgatója, a Szegedi Biológiai Kutatóközpont főigazgatója folyamatos szakmai támogatását, konstruktív kritikáját és bátorítását.

Szeretném kifejezni köszönetem a Szegedi Tudományegyetem Optikai és Kvantumelektronikai Tanszékén működő TeWaTi lézertudományi munkatársainak, akik a pikoszekundumos kapcsolás megvalósításában nyújtottak hatalmas segítséget. Elméleti tudásuk és gyakorlati tapasztalatuk nélkül ez a kísérletsorozat nem valósulhatott volna meg.

A hosszú névsort mellőzve (biztosan kimaradna valaki...) mondok ezúton köszönetet jelenlegi és volt munkatársaimnak, barátaimnak, a Biofizikai Intézet dolgozóinak az évek során nyújtott szakmai, technikai és morális segítségért.

Végül szeretnék köszönetet mondani szüleimnek és testvéremnek, akik életem során mindvégig segítettek, támogattak, elviseltek... és legtöbbször hagyták, hogy a magam útját járjam.

Köszönöm!

Fábián László
Biofizikai Intézet
Szeged, 2012 június