

Zárójelentés a T048 725 sz. 'Ultragyors lineáris és nemlineáris optikai folyamatok makromolekulákon' című OTKA pályázatról

1. Femtoszekundum időfelbontású spektroszkópai mérőegységek továbbfejlesztése

1.1. Ionosan porlasztott, szélessávú dielektrikum tükrök és diszperziós szabályozó egység kifejlesztése

Az MTA SZBK Biofizikai Intézetében létrehozott fs időfelbontású pumpa-próba mérőegységben a spektrálisan hangolható fényforrást egy Ti:zafír lézerrel pumpált PPLN (Periodically Poled Lithium Niobate) kristályon alapuló OPO (Optical Parametric Oscillator) biztosítja. Eredeti kiépítésében ez az egység csak bizonyos hullámhossz tartományban működött stabilan. A széles hullámhossz tartományban való folyamatos hangolhatóság biztosítása érdekében szükségessé vált az OPO optikai elemeit jellemző reflexiós és diszperziós paraméterek optimalizálása.

A fenti céloknak megfelelően új, ultraszélessávú, ionosan porlasztott, 100 fs-os működést biztosító (csörpölt) dielektrikumtükröket (1) terveztünk az OPO-hoz, melyek az 0.9-1.58 mikronos hullámhossz tartományon nagy visszaverő képességgel rendelkeznek ($R > 99.6\%$), illetve átlátszanak a pumpa hullámhosszakra ($R < 20\%$ a 750-850 nm-es tartományon). A csörpölt tükrök diszperziója 0 és -200 fs^2 között változik a nagyreflexiójú tartományon. Az OPO hangolhatóságának egyik eszköze a rezonátorhossz változtatása. A stabil működés feltétele a Ti:zafír lézerrel való pontos szinkronpumpálás, ami változó rezonátorhossz mellett csak akkor teljesülhet, ha a teljes rendszer diszperziója kellően nagy és szabályozható. Ennek elérése érdekében egy prizmás diszperzió szabályozó egységet építettünk be az OPO-ba, mellyel a diszperzió a $-2000 - 2000 \text{ fs}^2$ tartományban tetszőleges értékre állítható, mely által az OPO igen stabil (kb. 1% ingadozású) működése biztosítható. A nagy diszperziós érték alkalmazása az impulzushossz növekedését vonja maga után, amely azonban az OPO után elhelyezett hasonló prizmás egységgel kompenzálható.

1.2. Rövid impulzusú OPO elrendezés kifejlesztése

A pumpa-próba mérőrendszer alkalmazása során nem csak a pumpa illetve próba impulzusok hangolási tartománya határozza meg a rendszer alkalmazhatóságát, hanem az időfelbontás javítása érdekében fontos mind a pumpa, mind a próba impulzusok időbeli alakjának rövidítése. Ennek alapvetően két korlátja van: egyrészt a pumpa és jel impulzusok különböző jelterjedési sebessége a frekvenciakonvertáló eszközben, illetve a fázisillesztési tartomány szélessége. Az előbbi az ún. XXZ (idler, signal, pump) fázisillesztés alkalmazásával, míg utóbbi a pumpáló hullámhossz megfelelő megválasztásával (hagyományos ZZZ fázisillesztéssel) érhető el. Elméleti számításaink alapján kimutattuk, hogy 880 és 1050 nm közé eső pumpa hullámhossz esetén gyakorlatilag egyetlen PPLN periódus alkalmazása esetén is biztosítható a széles sávban hangolható működés. Ez 900 nm-es gerjesztő impulzusok esetén a 1250-1500 nm-es tartományt jelenti. Számításaink kísérleti alátámasztása érdekében az MTA SZFKI-ban felépített Ti:zafír lézer 880 nm-es, 100 fs-os impulzusaival pumpált, PPLN OPO segítségével FWHM 61 nm széles spektrumú impulzusokat állítottunk elő. A spektrum Fourier transzformációval számított időalakja kb. 15 fs hosszúságúra adódott. Autokorrelátor (APE GmbH) segítségével meghatározva az impulzusok autokorrelációs függvényét, abból 40 fs-nál rövidebb impulzushosszra következtettünk, ami megfelelt a gyári

autokorrelátor időfelbontásának, vagyis a mért impulzusok ennél feltehetőleg valóban jóval rövidebben voltak.

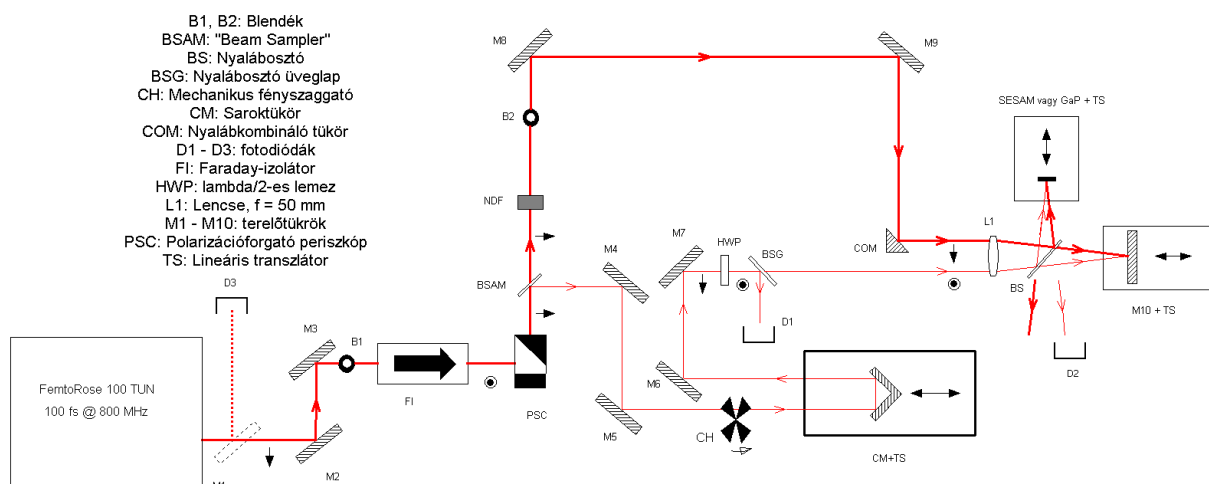
Az ultragyors OPO-t mint intenzív IR fényforrást felhasználtuk a fentiekben ismertetett tükrökészlet diszperziós értékeinek jellemzésében.

1.3. Félvezető alapú telítődő abszorbens minták tranziens abszorpciós tulajdonságainak vizsgálata

A MTA SZFKI-ban tranziens abszorpció mérésére épített mérőrendszerünkön a jel-zaj viszony növelése érdekében mind az optikai elrendezést, mint az adatgyűjtést és jelfeldolgozást végző elektronikus hardver és szoftver rendszert tökéletesítettük. A készülék tesztelésére először egyszerű valós fizikai rendszeren kívántunk méréseket végrehajtani. Erre a femtoszekundumos szilárdtestlézerek és optikai szállérezek módusszinkronizálására használatos félvezető alapú telítődő abszorbens (SESAM, SEmiconductor Saturable Absorber Mirror) minták (2) bizonyultak a legalkalmasabbnak. Vizsgálataink során $GaAs$ hordozóra felvitt periodikus $AlAs / Al_{0.15}Ga_{0.85}As$ rétegekből álló SESAM mintákon meghatároztuk a telítési intenzitás értékeit és tranziens abszorpció időállandóit.

A megfelelő pumpa- és próbanyaláb teljesítmények meghatározása a mintákra jellemző telítési intenzitás értékeket Z-scan mérésekkel (3) állapítottuk meg. Ennek során a mintát Ti:zafír lézer 800 nm-es fókuszált nyalábjával megvilágítva, azt a fókuszcsík környékén az optikai tengely mentén különböző pozíciókba toltuk, ezáltal különböző energiasűrűséggel gerjesztettük. Mivel a SESAM reflexiója az utóbbi mennyiség növelésekor növekszik, a beeső és a visszavert teljesítmény mérésével követhetjük a reflexió, és ebből az abszorpció telítődését. Megállapítottuk, hogy a mintákon $500 \frac{\mu J}{cm^2}$ energiasűrűség felett már jelentős telítődési hatás mutatkozik.

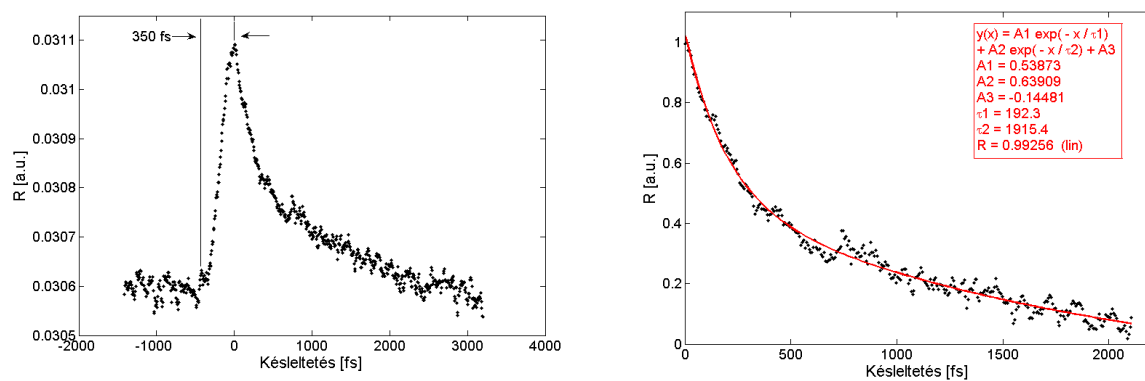
Az tranziens abszorpció mérésére alkalmas módosított elrendezésünk az 1. ábrán látható.



1. ábra: A tranziens abszorpciós mérési elrendezés.

Lényeges változás a korábbiakhoz képest, hogy a pompa és a próba nyaláb a mostani elrendezésben egymással párhuzamosan, de nem kollinearisan halad a mintára való fókuszálást megelőzően. Ennek köszönhetően a mintáról való reflexió után a nyálábok térben szétválnak, ezáltal minimalizálva a nagy energiájú pompa impulzusok detektorba jutását. A SESAM tulajdonságaiból következik, hogy a pompa és a próba nyáláb hullámhossza azonos kell legyen. A lézerforrásként használt Ti-zafír oszcillátort (FemtoRose 100 TUN, R&D Ultrafast Lasers Kft) 800 nm-re hangoltuk, ez ugyanis a SESAM működési hullámhossztartományába esik, s az oszcillátor működési paraméterei is itt optimálisak. A mérés során a lock-in detektálást alkalmaztunk, a lézernyalábokat egy mechanikus fényszaggatóval 25 Hz - 1 KHz-en modulálva. Az egyes nyálábokhoz tartozó fényintenzitásokat PIN fotodiódákon keresztül egy 4-csatornás, 24 bites, 50 kHz mintavételezési frekvenciájú adatgyűjtő kártya detektálta. A mérésvezérlést és adatgyűjtést egy általunk kifejlesztett LabView alapú végezte.

Feltételeztük, hogy a SESAM tranziens abszorpciójának kinetikája két exponenciális folyamattal írható le. A mérési és illesztési eredmények a 2. ábrán láthatók, ezekből az időállandókra a $\tau_1 = 140 \text{ fs} - 190 \text{ fs}$ és $\tau_2 = 1.2 \text{ ps} - 1.9 \text{ ps}$ értékek adódtak, mely alapján a vizsgált SESAM minták gyors abszorberként kategorizálhatók.



2. ábra Átlagolt tranziens abszorpciós görbe és biexponenciális illesztése

A fent ismertetett eredmények elsősorban az MTA SZBK és SZFKI együttműködésével kifejlesztett mérőműszerek technikai tökéletesítését és tesztelését célozták. Megítélésünk szerint további fejlesztések eredményeként az OPO egység (vagy akár a teljes fs-os pumpa-próba mérőegység) piaci terméké válhat. A fejlesztési jellegnek megfelelően ezeket az eredményeket nemzetközi folyóiratokban nem publikáltuk, hazai konferencián azonban bemutattuk, és ezekhez kapcsolódóan egy diplomamunka is létrejött.

SZIPŐCS, R., MAKAI, A., SÁNDOR, P., HEBLING, J. and GROMA G.: *Broadband and Broadly Tunable Femtosecond Pulse Laser and Parametric Oscillators for Applications in Femtobiology*, Regional Biophysics Conference, Balatonfüred, 2007

SÁNDOR, P.: *Femtosekundumos időfelbontásos lézerspektroszkópai mérőrendszer fejlesztése*, BME diplomamunka, 2008

2. Modellfüggetlen, nemparemetrikus dekonvolúciós kiértékelési eljárás kidolgozása

Bár napjainkban a látható tartományban 10 fs-nál rövidebb lézérimpulzusok is viszonylag egyszerűen előállíthatók, a széles körben használatos kinetikai mérőberendezésekben a pumpa és próba impulzusok hossza általában a 100 fs időtartományba esik. Ez legtöbbször összemérhető a vizsgálni kívánt jelenségek karakterisztikus időállandóival, ami a mérőkészülék és a mérendő jel dekonvolúciójának szükségességét vonja maga után. Elméleti vizsgálatainkban részletes leírását adtuk a megfelelő dekonvolúciós problémának, és részletesen elemeztünk egy sor elterjedt numerikus eljárást, annak érdekében, hogy a mért értékekből a kinetikai jelet optimálisan származtathassuk, anélkül, hogy arról előzetesen bármiféle modellszerű elképzelésünk lenne.

Numerikus tesztheink alapján megállapítottuk, hogy az iteratív időtartománybeli stratégiák közül a Bayes (4) és a Janson módszer (5), a frekvenciatartományban végrehajtott inverz szűrési eljárások közül pedig az adaptív Wiener szűrés (6) és a regularizációs módszer (7) a legalkalmasabb a femtoszekundumos kinetikai adathalmazok elemzésére. Összehasonlító vizsgálataink alapján kiderült, hogy ezek a modellfüggetlen módszerek hasonlóan eredményesek, mint a klasszikus rekonvolúciós eljárások, melyek feltételezik a pontos kinetikai és fotofizikai modell előzetes ismeretét. Ugyanakkor, ha a modell mégis rendelkezésre áll, akkor a modellfüggetlen dekonvolúciót követő statisztikai elemzéssel a modell paraméterei megbízhatóbban állapíthatók meg, mint a rekonvolúciós módszerrel. A szintetizált adatokon kívül a modellfüggetlen eljárásokon alapuló programunkat sikerrel alkalmaztuk valós femtoszekundumos kinetikai mérések kiértékelésére is.

A fenti eredmények az ELTE Fizikai Kémiai Tanszékén jöttek létre, és azokból az alábbi publikációk születtek:

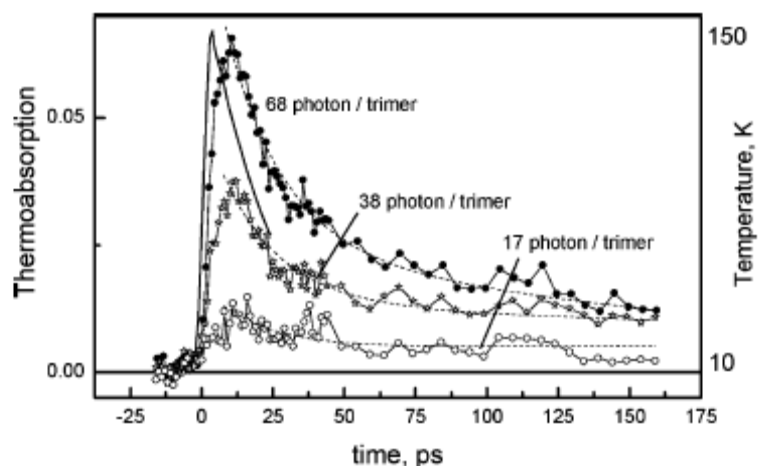
BÁNYÁSZ, Á. and KESZEI, E.: *Model-free deconvolution of femtosecond kinetic data*, J. Phys. Chem. A. 110: 6192-6207, 2006

BÁNYÁSZ, Á.: *Ulagyors kinetikai adatok modellfüggetlen dekonvolúciója, és uracilszármazékok gerejesztett állapotának tanulmányozása*, ELTE TTK PhD értekezés, 2006

3. Fotoszinetikus fénybegyűjtő komplexeken fellépő, a fénykárosodást kivédő termooptikai jelenségek kinetikájának meghatározása

A magasabb rendű növényekben a PSII fotoszisztéma klorofill *a/b* fénybegyűjtő komplexe (LHCII) az elsődleges fénybegyűjtési funkcióján kívül számos regulációs folyamatban is szerepet játszik (8), biztosítva ezzel a környezeti változásokhoz való adaptációt. Az adaptáció eredményeként a fotoszintézis nagyon különböző fényintenzitás viszonyok között is működni képes. Nagy fényintenzitások esetén az túlzott energiaelnyelés káros felmelegedéssel járna, melyet az LHCII-nek megfelelő hődisszipációval kell kivédenie. A felesleges energia disszipációs mechanizmusának feltérképezése céljából széles hőmérsékleti tartományban (10 – 290 K) megvizsgáltuk az LHCII gerjesztését követő lokális hőmérséklet változásokat. Minthogy a klorofill *a* és *b* molekula abszorpciós spektruma egyaránt hőmérsékletfüggő, az LHCII tranziens abszorpciójának mérésével követhető volt a lokális hőmérséklet kinetikája.

Megállapítottuk, hogy szobahőmérsékleten az abszorpció hatására nem lép fel mérhető lokális felmelegedés, alacsony hőmérsékleten azonban, ha impulzusonként egy LHCII trimerben több mint 10 exciton keletkezik, az számottevő lokális felmelegedést eredményez. A gerjesztési



3. ábra Hőmérséklet lecsengési görbék és illesztésük 2 exponenciálissal

energia hővé történő átalakulása exciton-exciton annihilációval (9) magyarázható. A gerjesztést követően a hőenergia a klorofill *a* molekulákon lokalizálódik. Intenzív fényvel való gerjesztés esetén ez több mint 100 K lokális hőmérsékletemelkedést jelent. A hőmérséklet lecsengési kinetikái jól illeszthetőek voltak két exponenciális folyamattal (3. ábra). Megállapítható volt, hogy a gyorsabb (20 ps) fázis a fehérjén belüli, a lassabb (200 ps) pedig az oldat felé irányuló hőátadási folyamatokat tükrözi.

A fenti eredmények az MTA SZBK Növénybiológiai Intézet, az Institute of Physics, Vilnius, Litvánia és a Department of Theoretical Physics, Vilnius University, Vilnius, Litvánia együttműködéséből születtek, az alábbi publikációval:

GULBINAS, V., KARPICZ, R., GARAB, G. and VALKUNAS, L.: *Nonequilibrium heating in LHCII complexes monitored by ultrafast absorbance transients*, Biochemistry, 45, 9559-9565, 2006

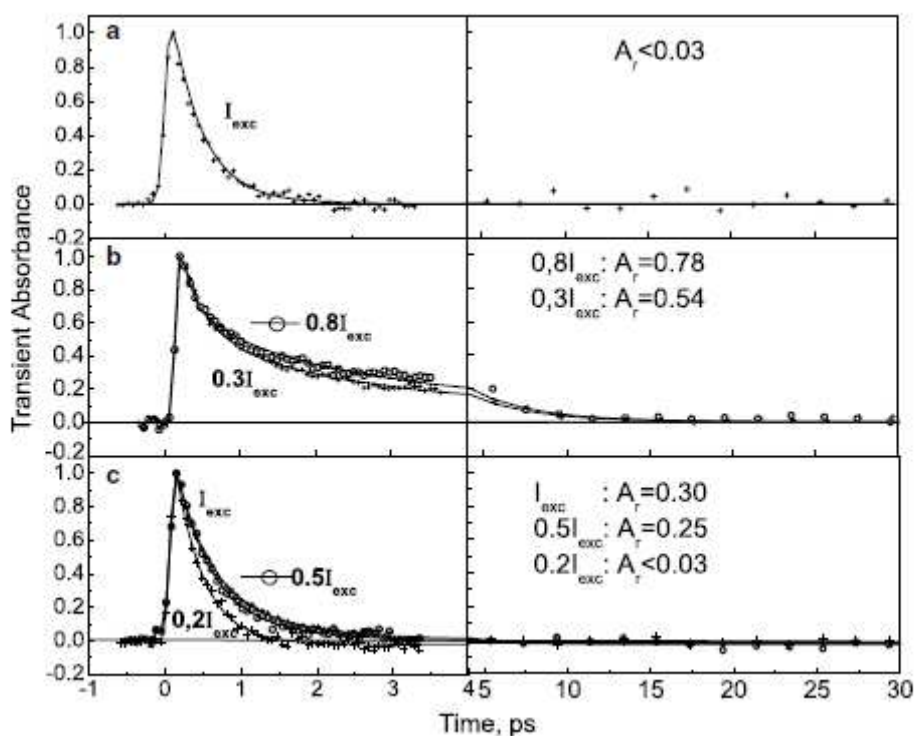
4. Natív és módosított bakteriorodopszin minták fényindukált fotociklusának ultragyors abszorpciókinetikai jellemzése

A bakteriorodopszinban (bR) fellépő fényindukált ultragyors töltésmozgási folyamatok kísérleti tanulmányozásához (lásd 5. és 6. fejezet) *Halobacterium salinarum* sejtekből kivont, szárított, orientált bíbor membrán mintákra van szükség (10). Lényeges volt tehát, hogy az elektromos jelek kinetikai vizsgálatával párhuzamosan a retinál kromofór gerjesztett állapotának és az azt követő ultragyors intermedierek kinetikáját ezeken a mintákon optikai módszerekkel feltérképezzük. Ezt elsősorban az indokolta, hogy korábbi vizsgálatainkban a bR fotociklus lassú (ms-os életidejű) intermedierei esetében jelentős eltéréseket tapasztaltunk a vizes szuszpenzióban és a szárított mintákon fellépő kinetikai paraméterek között (10).

50 fs időfelbontású pumpa-próba mérésekkel összehasonlító vizsgálatokat végeztünk a szárított bR natív és módosított (savas bíbor és savas kék) formáin fellépő fényindukált abszorpciókinetikáin vizes közegben és szárított mintákon. Ismeretes, hogy a módosított bR-ek esetében vizes szuszpenzióban a retinál kromofór gerjesztett állapotának élettartama és az azt követő J és K intermedierek kialakulásának kinetikája jelentősen megnövekszik a natív mintához képest (11). Megállapítottuk, hogy a szárított minták esetén hasonló a helyzet, a mért kinetikai paraméterek és a fotociklus határfoka a natív és a módosított minták esetében sem tért el lényegesen a vizes közegben mért értékektől. Markáns ellentétben tehát a

fotociklus lassú lépéseivel, a hidratáltság foka a bR primer folyamataira csekély befolyással van.

A bR ultragyors optikai és elektromos jelenségeik tanulmányozásához gyakran erősített lézerekre van szükség, melyek jellemzően kHz-es ismétlődési frekvenciával működnek. Ebben az esetben előfordulhat, hogy nagy fényintenzitások esetén az egyes lassú fotointermedierek a mérés során felhalmozódnak, és a későbbi impulzusokkal ezeke is gerjesztjük. Megállapítottuk, hogy a kinetikákban nagy intenzitású gerjesztésnél fellépő lassú komponens (4. ábra) ilyen folyamatból származó melléktermék, amely a minta megfelelő forgatásával eliminálható.



4. ábra 471 nm-nél különböző gerjesztési intenzitásokkal mért bR abszorpciókinetikák (a) forgatott vizes mintán, (b) szárított mintán, (c) álló vizes mintán.

A fenti eredmények az MTA SZBK Biofizikai Intézete és az Laboratory for Optical Bioscience, Ecole Polytechnique, Palaiseau, Franciaország együttműködéséből születtek, az alábbi publikációval:

COLONNA, A., GROMA, G.I. and VOS, M.H.: *Retinal isomerization dynamics in dry bacteriorhodopsin films*, Chem. Phys. Lett. 415: 69-73., 2005

5. Femtoszekundumos koherens infravörös emissziós vizsgálatok bakteriorodopszinon

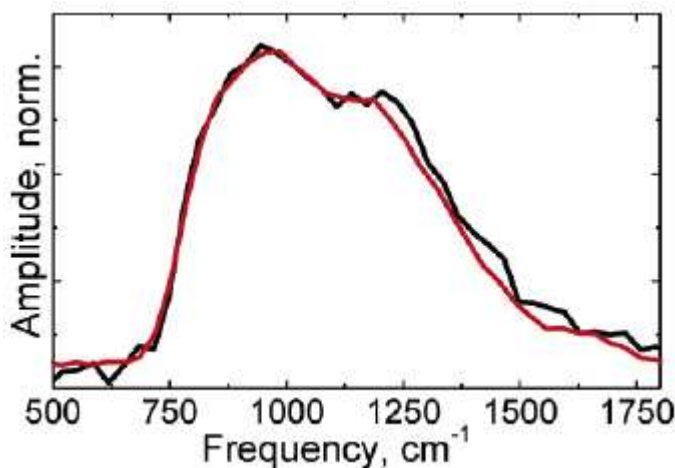
Korábbi koherens infravörös emissziós méréseinkből (12) megállapítottuk, hogy bR esetén az emisszió két komponensből tevődik össze. Ezek egyike a másodrendű nemlineáris optikai jelenségek körébe tartozó rezonáns optikai egyenirányítási folyamat (lásd 6. és 7. fejezet), a másik pedig egy többmódusú vibráció. Jelen pályázatunk keretében mindkét jelenséget részletesen tanulmányoztunk.

5.1. A retinál kromofór gerjesztése során fellépő dipólmomentum változás meghatározása

A bR retinál kromofórjának optikai tulajdonságait elsősorban polién lánc határozza meg, mely labilis π -elektronrendszerrel rendelkezik. Kvantumkémiai számításokból és Stark-effektuson alapuló mérésekből ismert (13), hogy gerjesztés során az elektronszerkezet jelentősen módosul, ami az alap- és gerjesztett állapot közötti nagymértékű dipólmomentum változásnak felel meg. A 7. fejezetben leírt módszerrel kimutattuk, hogy ez a dipólmomentum változás a forrása a bR-ből származó koherens IR sugárzás rezonáns optikai egyenirányítási komponensének. Megfelelő kalibrálással tehát e jel nagyságából kiszámítható a kromofór Franc-Condon átmenete során fellépő dipólmomentum változás nagysága.

A koherens IR emisszió mérések során egy interferogramot állítunk elő a vizsgálni kívánt minta és egy referencia fényindukált emissziójából, oly módon, hogy a két anyag gerjesztése közötti időtartamot folyamatosan változtatjuk és a két sugárzás interferenciájából származó jelet detektáljuk (12). Jelen kísérletünkben referenciaként AgGaS_2 kristályt alkalmaztunk, amely megvilágítás hatására (nemrezonás) optikai egyenirányítás következtében emittál, a gerjesztő és az IR fényt számottevően nem abszorbeálja és másodrendű szuszeptibilitása pontosan ismert. Méréseink során meghatároztuk a bR/ AgGaS_2 interferogramot, majd a minta helyébe egy másik AgGaS_2 kristályt elhelyezve az $\text{AgGaS}_2/\text{AgGaS}_2$ interferogramot is.

Kísérleti elrendezésünk a közeli sugárzási zónában (near-field) való megfigyelésnek felelt meg, mely esetben a sugárzás térerőssége a mintában létrejövő polarizáció első deriváltjával arányos (14). Minthogy a gerjesztő impulzus hossza (10 fs) lényegesen rövidebb volt bR gerjesztett állapotának 500 fs-os élettidejénél (15) a dipólmomentum változás a gerjesztő impulzus burkológörbéjének integráljával, az IR emisszió térerőssége tehát magával a burkológörbével arányos. Az AgGaS_2 kristályon végbemenő optikai folyamatok modellje azt



5. ábra A bR/ AgGaS_2 (fekete) és az $\text{AgGaS}_2/\text{AgGaS}_2$ (piros) interferogram normált teljesítményspektruma

mutatta, hogy a gerjesztő és az IR impulzus haladási sebességének jelentős különbsége miatt az innen származó emisszió térerőssége is a burkológörbét követi. Ezt a két interferogram teljesítményspektrumának összehasonlításából kísérletileg is megerősítettük (5. ábra).

A megfelelő modellparamétereket alkalmazva tehát a jelek nagyságából a retinál dipólmomentuma kiszámítható volt. Ez 11 D értékűnek adódott, ami egyenértékű azzal, ha egy elemi töltés a retinál molekula hosszának felével mozdul el.

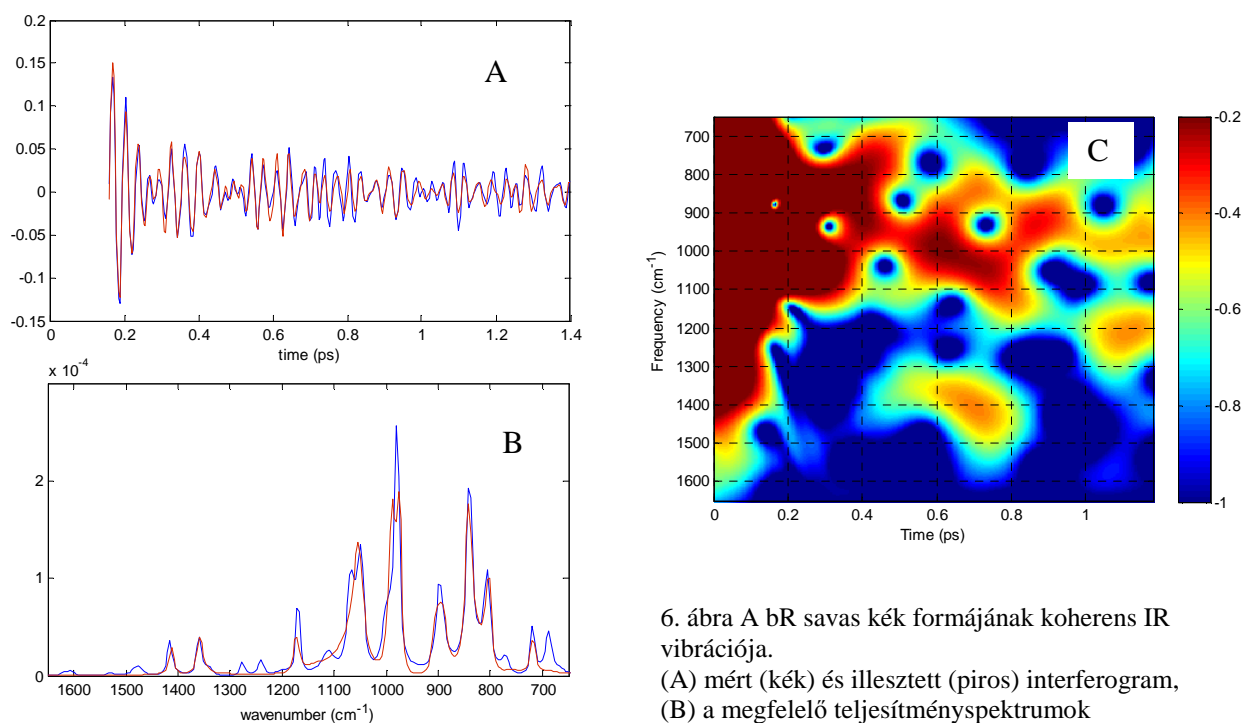
A fenti eredmények az MTA SZBK Biofizikai Intézete és az Laboratory for Optical Bioscience, Ecole Polytechnique, Palaiseau, Franciaország együttműködéséből születtek, az alábbi publikációval:

COLONNA, A., GROMA, G. I., MARTIN, J.-L., JOFFRE, M. and VOS, M. H: *Quantification of sudden light-induced polarization in bacteriorhodopsin by optical rectification*, J. Phys. Chem. B. 111: 2702-2710., 2007

5.2. A gerjesztést követő koherens vibrációs folyamatok jellemzése

A bR gerjesztését követő, 1 ps-nál is hosszabb ideig mérhető többmódusú koherens vibráció az optikai egyenirányítási jelnél lényegesen kisebb, így ennek tanulmányozása céljából korábbi méréseinket nagy pontossággal meg kellett ismételnünk. Annak eldöntése érdekében, hogy az egyes módusokhoz tartozó rezgések a gerjesztett vagy a már visszatért alapállapotban mennek-e végbe, a natív szárított minták mellett az előzőekben tárgyalt, hosszabb gerjesztett állapottal rendelkező savas kék mintákat is vizsgáltunk.

Az vibrációs folyamatok a frekvenciatartományba való transzformálással különíthetők el jól egymástól. Az ebben a tartományban széles folytonos spektrummal rendelkező optikai egyenirányítási komponens zavaró hatását elkerülendő az interferogramoknak csak a gerjesztéstől számított 160 fs-tól kezdődő szakaszát vizsgáltuk. A teljesítményspektrumokat az egyszerű Fourier-transzformációnál hatékonyabb Yule-Walker (maximum entropy) módszerrel (16) határoztuk meg. Egy jellegzetes interferogram és a hozzá tartozó teljesítményspektrum a 6. A és B ábrákon látható.



6. ábra A bR savas kék formájának koherens IR vibrációja.
(A) mért (kék) és illesztett (piros) interferogram,
(B) a megfelelő teljesítményspektrumok
(C) spektrogram

A teljesítményspektrumokon a kísérletileg megfigyelhető 600-1600 cm⁻¹ tartományban mindkét minta esetében 8-9 jól elkülöníthető csúcs volt megfigyelhető. A savas kék formához tartozó csúcsok a natívokénál lényegesen nagyobbak voltak. Eredetük alapján a csúcsok a

750-1050 cm^{-1} tartományban a retinál molekula HOOP (hydrogen out of plane) módusainak, a 1100-1400 cm^{-1} tartományban a pedig polién váz C-C rezgéseinek feleltethetők meg (17).

Az egyes módusok időbeli lecsengésének szemléltetésére az idő- és frekvenciatartományokat kombináló kétdimenziós spektrogram (csúsztatott időablakos Fourier-transzformáció) használható (6. C ábra). Ennek alapján megbecsültük az egyes módusok lecsengési idejét, melyek a várakozásnak megfelelően, a savas kék minta esetében általában lényegesen hosszabbak voltak. Ezután a becsült kezdeti értékekkel végrehajtottunk egy illesztési eljárást, melyben a módusok frekvenciája, fázisa, amplitúdója és exponenciális lecsengési időállandója meghatározandó paraméterek voltak. Az illesztett görbék a 6. A és B ábrákon piros vonalakkal láthatók. Az optimalizált időállandók alapján megállapítható volt, hogy a módusok többsége a gerjesztett állapothoz rendelhető.

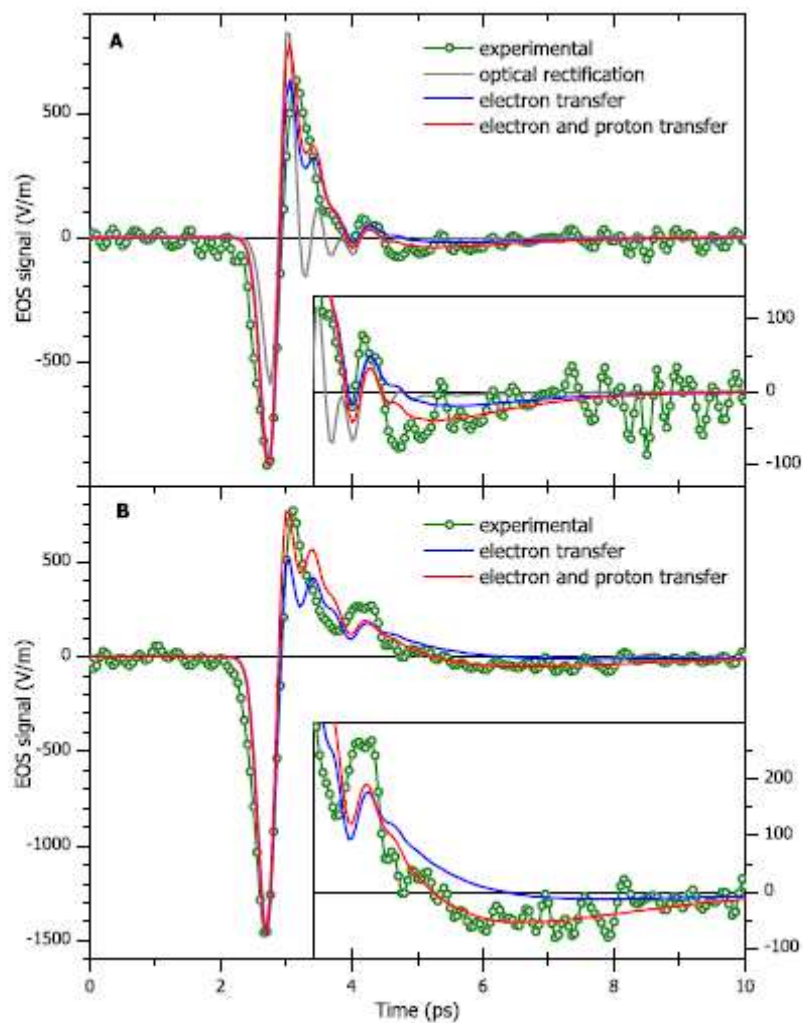
A fentiekben leírt kiértékelések a pályázat utolsó fázisában készültek, a publikálásra benyújtandó kéziraton jelenleg dolgozunk. A munka kezdeti eredményeit több konferencián bemutattuk, az alábbi absztrakt nemzetközi folyóiratban is megjelent:

GROMA, G.I., COLONNA, A., JOFFRE, M., VOS, M.H. and MARTIN, J.-L.: *Sudden polarisation and coherent vibration in bacteriorhodopsins*, EUR. BIOPHYS. J. 34: 573, 2005

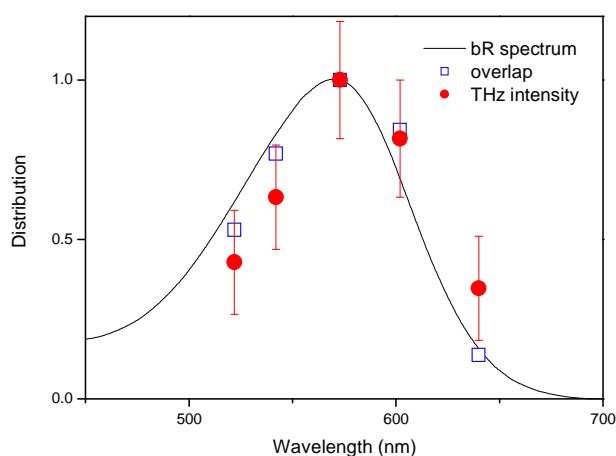
6. Fényindukált korrelált elektron- és protonmozgás direkt kimutatása bakteriorodopszin mintákon terahertzes emisszió vizsgálatával

A bR molekulában fényelnyelés hatására bekövetkező primer töltésmozgási folyamatok hagyományos elektronikai eszközökkel a 100 GHz alatti tartományban (18), az előzőekben tárgyalt koherens IR emisszióval a 18-50 THz intervallumban tanulmányozhatók. Ugyanakkor a retinál kromofór 500 fs-os életidejű gerjesztett állapotának (15) lecsengéséhez, illetve a K intermedier néhány ps alatt bekövetkező kialakulásához (19) tartozó feltételezhető korai protonmozgások éppen az eddig kísérletileg hozzáférhetetlen 0.1-18 THz-es tartományba esnek. Célul tűztük ki tehát, hogy ezeket – a bR fényenergia hasznosításában alapvető szerepet játszó – töltésmozgásokat a jelenleg igen dinamikus fejlődő terahertzes mérés technikai módszerekkel követhetővé tegyük. Ennek fizikai háttere, hogy az ultragyors töltésmozgások Hertz-dipólként elektromágneses sugárzás forrásává válnak (lásd 5. és 7. fejezet).

Az általunk felépített kísérleti elrendezés az elektrooptikai mintavételezés módszerén alapult. Ennek lényege, hogy az elektrooptikailag aktív kristályokon (esetünkben ZnTe-on) a mintából a pumpáló fényimpulzus hatására emittált terahertzes sugárzás elektromos tere a Pockel-effektus alapján kettőstörést generál, amely a kristályon változó késleltetéssel áthaladó próba impulzussal mérhető (14). Ezáltal a mintában lezajló polarizációs folyamatok az időtartományban (tehát teljes fázisinformációval) követhetők. Kísérletünkben szárított orientált bR mintákat 100 fs időtartamú lézerympulzusokkal rezonáns hullámhosszon (570) nm megvilágítva az indukált terahertzes sugárzását annak távoli és közeli zónájában egyaránt detektáltunk.



7. ábra A bR-ből származó terahertzes sugárzás elektromos komponense és annak különböző modelleken alapuló szimulációja. (A) natív, (B) savas kék minta. Az insetekben a lassú fázis kinagyítva látható.



8. ábra A terahertzes sugárzás akciós spektruma összehasonlítva a bR abszorpciós spektrumával

Mint az a 7. ábrán látható, a mért terahertzes jel két jól elkülönülő szakaszból áll. A sugárzás keltését és terjedését szimuláló numerikus eljárással (14) a kísérleti görbét három különböző

modell megfelelő paramétereivel illesztettük. Mint várható volt, a nemrezonáns optikai egyenirányítást feltételező modell (szürke vonal) nem reprodukálta a kísérleti eredményeket. A retinál molekula gerjesztett állapotának evolúcióját követő intramolekuláris elektron transzlokációt feltételező – a 7. fejezet alapján a rezonáns optikai egyenirányításnak megfelelő – modell (kék vonal) jól leírta a gyors szakasz kinetikáját. Különösen a hosszabb gerjesztett állapottal rendelkező savas kék minta esetében azonban jól látható, hogy ez a modell nem ad számot a lassú, negatív szakasz fellépéséről. Feltételezve, hogy a fotociklus K intermedierének kialakulása során az elektronmozgással azonos irányú kezdeti protonmozgás is fellép, a szimuláció a teljes kísérleti görbét jól reprodukálta (piros vonal).

A modellünkben feltételezett intramolekuláris elektronmozgás rezonáns jellegének további bizonyítékaul a pumpáló impulzus hullámhosszának változtatásával felvettük a sugárzás gyors komponensének akciós spektrumát. Mint 8. ábrán látható, a sugárzás intenzitása valóban jól követi a minta és a pumpa impulzus spektrumának átfedéséből számított értékeket (kék négyszögek). A gerjesztési spektrum azonban némileg eltolódik a hosszabb hullámhosszak irányában, ami a mérések alatt kismértékben felhalmozódó intermedierek jelenlétével magyarázható (lásd 4. fejezet).

A kísérletileg megfigyelt korrelált elektron- és protonmozgást kézenfekvő úgy interpretálni, hogy közöttük oksági kapcsolat áll fenn, vagyis a nagyfokú gerjesztett állapotbeli elektronpolarizáció generálja a protonmozgást. Ennek figyelembevétele módosíthatja bR-ben lezajló primer energiaátalakulásról jelenleg elfogadott képet, amely kizárólag a retinál molekula fényindukált izomerizációjának tulajdonít kulcsszerepet.

Megemlítendő, hogy munkánk során elsőként sikerült biológiai objektumból származó koherens terahertzes emissziót kimutatni, első eset továbbá a protonmozgásból származó sugárzás megfigyelése is. Ennek megfelelően a jelen fejezetben leírtakat tartjuk a pályázat legjelentősebb eredményeinek. Ezen témakörben elért eredményeiért a témavezetőt 2008-ban az MTA Fizikai Díjában részesítették.

A fenti eredmények az MTA SZBK Biofizikai Intézete, a Pécsi Tudományegyetem Kísérleti Fizikai Tanszéke, a Chair for BioMolecular Optics, Ludwig-Maximilians-University, München és a Max Planck Institute for Solid State Research, Stuttgart közötti közreműködésből születtek. Munkánk jelentős részét az alábbiakban publikáltuk:

GROMA, G.I., HEBLING, J., KOZMA, I.Z., VÁRÓ, G., KUHL and RIEDLE, E: *THz radiation from light-induced electron and proton motion in bacteriorhodopsin.*, Ultrafast Phenomena XV, Proceeding of the 15th International Conference, Pacific Grove, USA, July 30 –August 4, 2006, Ed: P. Corkum, D. Jones, R. J. D. Miller, A. M. Wein, 2007

GROMA, G.I., HEBLING, J., KOZMA, I.Z., VÁRÓ, G., HAUER, J., KUHL, J. and RIEDLE, E: *THz radiation from bacteriorhodopsin reveals correlated primary electron and proton transfer processes*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105: 6888-6893, 2008

A terahertzes sugárzás közelmúltban meghatározott akciós spektrum és intenzitásfüggése a pályázat lezárása után kerül publikálásra.

7. Rezonáns másodrendű optikai alapfolyamatok egységes kvantumelektrodinamikai leírása

Az 5. és 6. fejezetben leírt ultragyors polarizációs folyamatokból származó sugárzási jelenségekhez hasonló folyamatokat korábban elsősorban kristályokon és félvezetőkön tanulmányoztak. Ezekben az esetekben a sugárzás legtöbbször optikai egyenirányítás által jön

létre, amely a másodrendű optikai folyamatok egyik alapjelensége. Monokromatikus hullámok esetén az anyagban létrejövő nemlineáris polarizáció másodrendű komponense a

$$\left[\cos(\omega t) \right]^2 = \frac{1}{2} \left[\cos(2\omega t) + \cos(0) \right] \quad [1]$$

kifejezéssel írható le, a jobboldal első tagja a közismertebb másodharmonikus generálást (SHG) írja le, a második, konstans tagot nevezik optikai egyenirányításnak (optical rectification, OR). Könnyen belátható, hogy impulzusok esetén, ha a kölcsönhatás nemrezonáns, a konstans érték helyett a az OR tag a pumpa impulzus burkológörbét követi (20). A bakteriorodopszin rezonáns pumpálása esetén ez az egyszerű leírás nyilvánvalóan nem helyes, és szemléletesen várható, hogy a generált OR időfüggésében fellép a gerjesztett állapot időbeli evolúciója. Meglepő módon azonban a rezonáns OR elmélete az irodalomban nem lelhető fel. Az 5. és 6. pontban bemutatott jelenségek pontos leírása érdekében ezért a kvantumelektrodinamika alapegyenleteiből kiindulva ki kellett dolgoznunk ezt az elméletet, melynek gondolatmenetét az alábbiakban röviden ismertetjük.

Levezetésünkben a kvantumelmélet Liouville-térbeli leírást alkalmaztuk (21), melynek keretében a pumpáló nyaláb $E(\mathbf{r}, t)$ elektromos tere által az anyagban keltett másodrendű polarizáció az időtartományban

$$P^{(2)}(\mathbf{r}, t) = \int_0^\infty dt_2 \int_0^\infty dt_1 S^{(2)}(t_2, t_1) E(\mathbf{r}, t-t_2) E(\mathbf{r}, t-t_2-t_1) \quad [2]$$

alakban írható le, ahol

$$S^{(2)}(t_2, t_1) = \left(\frac{i}{\hbar} \right)^2 \langle\langle V | \mathcal{G}(t_2) \mathcal{V} \mathcal{G}(t_1) \mathcal{V} | \rho(-\infty) \rangle\rangle \quad [3]$$

egy kétpontos átviteli függvény, melyben

$$\mathcal{G}(t) A \equiv \theta(t) \exp\left(-\frac{i}{\hbar} [H, A] t \right) \quad [4]$$

egy tetszőleges A operatorra ható Liouville-térbeli Green függvény, H az energiaoperátor, $\theta(t)$ az egységugrás függvény, $V = \sum_{a,b} \mu_{ab} |a\rangle\langle b|$, $\mu_{ab} = \langle a | V | b \rangle$ a Hilbert-tér dipólmomentum

operátora, $\mathcal{V} A = [V, A]$ az ennek megfelelő Liouville-térbeli operátor, a szögletes zárójel pedig a kommutációs operátort jelöli.

Frekvenciatartományra áttérve a másodrendű szuszceptibilitás

$$\chi^{(2)}(-\omega_s; \omega_1, \omega_2) = \frac{1}{2} \rho_0 \sum_p S^{(2)}(\omega_1 + \omega_2, \omega_1) \quad [5]$$

alakban fejezhető ki, ahol $\omega_s = \omega_1 + \omega_2$, ρ_0 az anyagi részecskék sűrűsége és \sum_p az ω_1 és

ω_2 permutációira való összegezést jelöl. A szuszceptibilitás konkrét alakja az [4] Green függvény specifikálásával adható meg. Ennek lényeges eleme a gerjesztett állapotból való visszatérést leíró relaxációs mátrix, melynek Mukamel nyomán (21) a négydimenziós Liouville-térben a következőképpen definiálhatunk:

$$\Gamma_{aa,bb} (a \neq b) \equiv \gamma_{ab} \quad [6]$$

$$\Gamma_{aa,aa} \equiv -\gamma_a \equiv -\sum_{b(\neq a)} \Gamma_{bb,aa} \quad [7]$$

$$\Gamma_{ab,ab} = -\frac{1}{2} (\gamma_a + \gamma_b) - \hat{\Gamma}_{ab} \equiv -\Gamma_{ab} \quad [8]$$

Az irodalomban fellelhető levezetésekben a mátrix $\Gamma_{aa,bb}$ ($a \neq b$) nemdiagonális tagjait általában elhanyagolják. Részletes számításainkban megmutattuk, hogy a rezonáns OR leírásához viszont éppen ezekre a tagokra van szükség. A teljes mátrixot használva egy leegyszerűsített kétállapotú rendszer [3] átviteli függvénye számításaink szerint az

$$S^{(2)}(t_2, t_1) = \left(\frac{1}{\hbar}\right)^2 (P(0) - P(1)) \mu_{10}^2 (\mu_{11} - \mu_{00}) \theta(t_2) \theta(t_1) \left\{ -2 e^{-\frac{t_1+t_2}{T_2}} \cos[\omega_{10}(t_1+t_2)] + 2 e^{-\frac{t_2}{T_1}} e^{-\frac{t_1}{T_2}} \cos(\omega_{10}t_1) \right\} \quad [9]$$

alakba írható, ahol a 0 index az alap- az 1 pedig a gerjesztett állapotot jelöli, ω_{10} a rezonáns frekvencia, μ a dipólmomentum, $T_1 \equiv \frac{1}{\gamma_0 + \gamma_1}$ és $T_2 \equiv \frac{1}{\Gamma_{10}}$ pedig a közismert populáció és koherencia relaxációs időket jelöli. Látható tehát, hogy várakozásunknak megfelelően az átviteli függvényben, és [5] szerint a szuszceptibilitásban megjelenik a gerjesztett- és alapállapot dipólmomentumának különbsége és a gerjesztett állapot evolúcióját leíró csillapodási idők.

A [9] kifejezést felhasználva szimulációs számításokat végeztünk az OR jelek alakjára. Ezek nemrezonáns esetben reprodukálták a pumpa impulzus burkológörbét, rezonáns esetben pedig megfeleltek annak a szemléletes képnek, mely szerint a polarizáció kinetikája követi a gerjesztett állapot T_1 relaxációs idővel jellemzett evolúcióját, alátámasztva a 6. fejezetben alkalmazott intramolekuláris elektron transzlokációra alkalmazott modell helyességét.

A fenti eredményeket az OR komponens helyett az SHG tagra alkalmazva a szimulációink azt mutatták, hogy kétállapotú rendszert a rezonancia frekvencia felénél pumpálva az SHG jelben megjelenik egy T_2 koherencia relaxációs idővel jellemzett komponens. Ennek kísérleti megfigyelése tudomásunk szerint eddig nem történt meg. Megjegyezzük, hogy a projekt utolsó szakaszában több pályázati forrást összevonva vásároltunk egy fotonszámlálásra is alkalmas, extrém kis sötét zajjal rendelkező CCD kamerát, mellyel a fluoreszcencia up-conversion módszeréhez hasonló eljárással a jelenséget bakteriorodopszinon várhatólag kísérletileg is tanulmányozni tudjuk.

A fenti elméleti eredmények nagyrészt az MTA SZBK Biofizikai Intézetében születtek, de hozzájárultak a Laboratory for Optical Bioscience, Ecole Polytechnique, Palaiseau munkatársai is. Az elmélet végső formájában a pályázat utolsó szakaszában alakult ki, így publikálása 2009 folyamán várható. Kezdeti eredményeinkről többek között az alábbi konferenciaanyagban számoltunk be:

GROMA, G.I., COLONNA, A., JOFFRE, M., VOS, M.H. and MARTIN, J.-L.: *Resonant optical rectification. Theory and application to bacteriorhodopsin*, International Conference on Transient Chemical Structures in Dense Media, March 14-16, 2005, Paris, France, 2005

8. A pályázatban tervezett és végrehajtott feladatok összevetése

A pályázatban megvalósult technikai fejlesztések, tudományos vizsgálatok és az azokat végrehajtó kutatók döntő többségükben azonosak a tervezetben meghatározottakkal. Lényegesebb változások a következők:

A tervezetben eredetileg nem szerepelt a rövid impulzusú OPO kifejlesztése.

A bakteriorodopszinban fellépő ultragyors töltésmozgások terahertzes emiszióval történő vizsgálata a tervezettnél lényegesen nagyobb hangsúlyt kapott, és jelentősebb eredményeket ért el. Ezzel a módszerrel követhetővé váltak a kezdeti protonmozgásoknak a néhány ps-os időtartományba eső komponensei is. Ezáltal feleslegessé vált, hogy ezeket a folyamatoknak – eredeti tervek szerint a Szegedi Tudományegyetem Optikai és Kvantumelektronikai Tanszékével együttműködésben – a gyengébb időfelbontást biztosító hagyományos elektronikai eljárásokkal vizsgáljuk.

Mint hogy a terahertzes kísérletek és kiértékelésük a tervezettnél több időt is igényeltek, az eredetileg citokróm-C fehérjén tervezett fényindukált abszorpciókinetikai vizsgálatok a pályázat lezárásáig nem kerültek végrehajtásra.

A fenti változásokkal összhangban, a tervezettől eltérően Osvay Károly, Sarlós Ferenc, Zimányi László és Jávorfai László nem vett részt a pályázati munkában.

Irodalom

1. Szipőcs R, Ferencz K, Spielmann C, Krausz F (1994) *Opt Lett* 19: 201.
2. Tsuda S, Knox WH, de Souza EA, Yan WY, Cunningham JE (1996) *IEEE J Sel Top Quantum Electronics* 2: 454-464.
3. Sheik-Bahae M, Said AA, van Stryland EW (1989) *Opt Lett* 14: 955-957.
4. Kennett TJ, Prestwich WV, Robertson A (1978) *Nuc Instrum Methods* 151: 285-293.
5. Jansson PA, Hunt RH, Pyle EK (1970) *J Opt Soc Am* 60: 692.
6. Gobbel GT, Fike JR (1994) *Phys Med Biol* 39: 1833.
7. Daróczy T, Kollár I (1984) *IEEE Trans Instrum Meas* 45: 417.
8. Allen JF, Forsberg J (2001) *Trends Plant Sci* 6: 317-326.
9. van Amerongen H, Valkunas L, van Grondelle R (2000) *Photosynthetic excitons* (World Scientific Co.).
10. Varo G, Keszthelyi L (1983) *Biophys J* 43: 47-51.
11. Logunov SL, ElSayed MA, Song L, Lanyi JK (1996) *J Phys Chem* 100: 2391-2398.
12. Groma GI, Colonna A, Lambry JC, Petrich JW, Varo G, Joffre M, Vos MH, Martin JL (2004) *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 7971-7975.
13. Mathies R, Stryer L (1976) *Proc Natl Acad Sci USA* 73: 2169-2173.
14. Cote D, Sipe JE, van Driel HM (2003) *J Opt Soc Am B* 20: 1374-1385.
15. Dobler J, Zinth W, Kaiser W, Oesterhelt D (1988) *Chem Phys Lett* 144: 215-220.
16. Yule GU (1927) *Phil Trans Roy Soc* 226-A: 267-298.
17. Garavelli M, Niegri F, Olivucchi M (1999) *J Am Chem Soc* 121: 1023-1029.
18. Groma GI, Hebling J, Ludwig C, Kuhl J (1995) *Biophys J* 69: 2060-2065.
19. Lanyi JK (1992) *J Bioenerg Biomembr* 24: 169-179.
20. Bonvalet, A. & Joffre, M. (2005) in *Femtosecond Laser Pulses*, ed. Rulliere, C. (Springer, New York), pp. 309-331.
21. Mukamel S (1995) *Principles of Nonlinear Optical Spectroscopy* (Oxford University Press, Oxford).