

BEVEZETÉS

Az integrált optika fontos alapproblémája olyan anyagok felkutatása, amelyekkel megoldható az optikai áramkörök aktív fényvezérlése. Az e területen folyó intenzív kutatások ellenére eddig még nem találtak minden szempontból megfelelő nemlineáris optikai anyagokat.

A projekt keretében végzett kutatásaink arra irányultak, hogy fiziológiai funkcióik alapján ígéretesnek mutató fényérzékeny fehérjék (bakteriorodopszin, fotoaktív sárga fehérje, fikobiliproteinek) nemlineáris optikai tulajdonságait kutassuk. A fehérjékből készített szárított filmekből és innovatív integrált optikai elemekből épített hibrid – üveghordozó, fotopolimer, illetve porózus szilícium alapú - struktúrák segítségével sikeres optikai kapcsolási kísérleteket végeztünk. Megmutattuk, hogy az általunk fejlesztett fotonikus struktúrákból – esetenként azokat integrált mikroelektróda-rendszerrel kombinálva – igen érzékeny bioszenzorok is készíthetők. Megépítettünk továbbá egy - a kvantumösszefonódás jelenségét felhasználó - optikai rendszert, amely biológiai mikroszkópiás vizsgálatokra is alkalmas.

Az alábbiakban a munkaterv munkacsomagjai szerint csoportosítva foglaljuk össze az elért eredményeket.

EREDMÉNYEK

Fehérjék izolálása

A vizsgálandó fehérjék közül a bakteriorodopszin és a fikobiliproteinek az SZBK Biofizikai és Növénybiológiai Intézetében meghonosított hagyományos preparatív biokémiai eljárások segítségével történtek, halobaktérium illetve cianobaktérium tenyészetekből. Mindkét típusú mintából mintegy 10 mg tömegű fehérjét sikerült izolálnunk, ami több évre fedezte az optikai kísérletek aktívananyag igényét. A nagyobb hozam és a megbízhatóbb minőség biztosítása érdekében az előregedett Halobacterium salinarum törzs helyett újat szereztünk be a Freie Universitaet Berlin kutatóitól (Prof. Ramona Schlesinger laboratóriumából), amelyből történt első preparáció eredményei igen kedvezőek voltak. A fotoaktív sárga fehérje helyi izolálásának biztosítása érdekében felvettük a kapcsolatot Prof. Hironari Kamikubo-val (Nara Institute of Science and Technology), akitől a fehérjét kódoló szekvenciát tartalmazó plazmidot kaptunk. Ennek segítségével E. coli sejtekben expresszáztattuk a fehérjét, majd - a japán partner által rendelkezésünkre bocsátott preparációs receptet követve – izoláltuk azt, több milligrammos mennyiségben.

Biofilmek készítése

A bioelektronikai kutatások egyik legfontosabb általános problémája a szilárd hordozó és a biológiai minta határfelületének optimális kialakítása. A passzív integrált optikai struktúrák (hullámvezető felületek) biofunkcionalizálása céljából különféle fizikai illetve immunhisztokémiai eljárásokon alapuló protokollokat teszteltünk.

A fotopolimer, fénoxid vagy szilícium alapú integrált optikai struktúrák felületét úgy kell átalakítani, hogy egyrészt a hozzájuk asszociált fehérje-filmek megőrizze nemlineáris optikai tulajdonságait, másrészt megmaradjon az optikai minőséget biztosító mikrostruktúrájuk (vagyis minimális fényszórású határfelületet lehessen kialakítani). A szilárd hordozókat ezért olyan biokompatibilis réteggel célszerű bevonni, ami sima átmenetet tud képezni a hordozó és a fehérjeréteg között. Az optimális paraméterek függenek az adott fehérjétől, de az általánosságban elmondható, hogy az ellentétes töltésű rétegekből "layer-by-layer deposition" technikával felépített vékony polielektrolit filmek az esetek többségében

kiválóan megfelelnek a céloknak. Ezért különféle pozitív és negatív töltésű párokból kialakított polielektrolit filmek szerkezetét, topográfiáját és hidrofobicitását jellemeztük fizikai módszerek (atomerómikroszkópia, kvarc-kristály mikromérleg, ellipszometria és vízcsepp-kontaktszög mérés) segítségével. Megállapítottuk, hogy a 10 rétegből álló, erős, szintetikus poly(sodium 4-styrenesulfonate) / poly(diallyldimethylammonium chloride) (PSS/PDDA) filmek szuperhidrofil bevonatot képeztek, ellentétben a gyenge, természetes hialuronsav / chitosan (HA/Chi) rétegekkel, amelyek lényegesen kevésbé bizonyultak hidrofilnek. A filmek hidrofil/hidrofób tulajdonságai ugyanakkor hangolhatók voltak egy vagy több grafénoxid rétegnek a filmbe történő beépítésével. Növekvő számú grafénoxid réteg viszont a filmvastagság növekvő egyenetlenségét is okozta. Összességében elmondható, hogy a kísérletek fontos – és általánosítható - tanulságokkal szolgáltak a megfelelő bevonat készítése szempontjából, és sikeres kísérleteket folytattunk a módszernek mind bR-rel mind pedig a szolubilis PYP-pel történő kombinációjára.

(Publikáció: Tonya D. Andreeva, András Dér, Lóránd Kelemen, Rumen Krastev, Stefka G. Taneva: "Modulation of the internal structure and surface properties of natural and synthetic polymer matrices by graphene oxide doping", *Polymers for Advanced Technologies*, 2018).

Megvizsgáltuk, hogy Hofmeister-effektus segítségével hogyan módosítható a fehérjék kitapadása a hullámvezető felületére. Az MTA MFA és a Pannon Egyetem munkatársaival (Horváth Róbert illetve Vonderviszt Ferenc laboratóriumának kutatóival) kooperációban kimutattuk, hogy kozmotrop sók hatására az alak anizotrópiával rendelkező flagellin fehérjékből más orientációjú és rendezettebb filmek képződnek, mint kaotrop sók jelenlétében. Emellett elsőként sikerült kvantitatív kísérleti adatot meghatározni fehérje-víz-szilárd hordozó rendszer határfelületi feszültség értékére.

(Közlemény: Kovács et al.: Kinetics and Structure of Self-Assembled Flagellin Monolayers on Hydrophobic Surfaces in the Presence of Hofmeister Salts: Experimental Measurement of the Protein Interfacial Tension at the Nanometer Scale, *J. Phys. Chem. C* 122: 21375-21386 (2018)).

A cianobaktériumokból izolált fikobiliproteinek természetes közege ugyanakkor jóval komplexebb, amennyiben a membrán-kötött fotoszintetikus reakciócentrumokhoz asszociált antenna-komplexet ("fikobiliszómát") képeznek, így a makromolekuláris egység stabilitásához a lipidkörnyezet is hozzájárul. Utóbbinak a tanulmányozása céljából FTIR-spektroszkópiai módszerrel vizsgáltuk a vad típusú *Synechocystis*, illetve egy olyan mutáns komplex membránszerkezetét, amely több bilayer-képző, továbbá telítetlen szénláncú lipidet tartalmazott. Megállapítottuk, hogy a funkcionális fehérje-komplexek a vad típusú cianobaktériumban sokkal stabilabbak, rámutatva ezzel a lipid-fehérje kölcsönhatások fontosságára is ebben az esetben.

(Publikáció: Terezia Kovacs, Balazs Szalontai, Kinga Kłodawska, Radka Vladkova, Przemysław Malec, Zoltan Gombos, Hajnalka Laczko-Dobos: "Photosystem I oligomerization affects lipid composition in *Synechocystis* sp. PCC 68032", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, Volume 1864, Issue 10, October 2019, Pages 1384-1395.)

A biofilmek nemlineáris optikai (NLO) tulajdonságainak vizsgálata

Az általunk korábban kidolgozott kemometriai módszerrel a fotoaktív sárga fehérjéből származó filmek fotociklusát leíró modellt állítottunk fel, valamint meghatároztuk a spektrális változásokkal korreláltan bekövetkező törésmutató-változások nagyságát és kinetikáját. A kutatásokról több konferencián illetve nemzetközi iskolán beszámoltunk poszter formájában, a tudományos eredményeket összefoglaló kéziratot pedig benyújtottuk publikálásra.

(Szilvia Krekic, Dávid Nagy, Stefka G. Taneva, László Fábrián, László Zimányi, András Dér: "Spectrokinetic characterization of photoactive yellow protein films for integrated optical applications", *European Biophysics Journal*, July 2019, Volume 48, Issue 5, pp 465–473)

Hidrofilizált üveghordozóra rétegzett fehérje-filmek optikai minőségének javítása céljából a minták szárítását a víz-fehérje-glicerín elegy meghatározott arányának beállítása után végeztük el, majd ún. "Z-scan"-es kísérleteket kezdtünk meg a filmek optikai nemlinearitásának további jellemzésére. A kísérletek során kiderült, hogy a bR- és PYP-alapú filmek nagyobb nemlinearitást mutattak az általunk elérhető spektrumtartományban, mint a fikobiliproteinek, ezért a továbbiakban a bR- és PYP-mintákra koncentráltunk. A kísérletek egy részét a berlini Humboldt Egyetem "School of Analytical Sciences Adlershof (SALSA)" egységének Fotonikai Laboratóriumában végeztük. (Tanulmányút: Krekic Szilvia, Berlin.)

Fotoaktív sárga fehérjéből készült száraz filmek nemlineáris optikai tulajdonságait „Optical Waveguide Lightmode Spectroscopy” (OWLS-) technikával is jellemeztük különféle relatív páratartalmak mellett, a lehetséges integrált optikai alkalmazások szempontjait szem előtt tartva. A detektált törésmutató-változások nagyfokú korrelációt mutattak az abszorpcióváltozásokkal, nagyságuk és kinetikájuk pedig lehetőséget nyújt arra, hogy integrált optikai alkalmazások aktív elemeiként hasznosulhassanak a jövőben.

(Szilvia Krekic, László Fábrián, Stefka G. Taneva, László Zimányi and András Dér: "Integrated optical characterization of light-sensitive protein films", 17th International Congress on Photobiology; 18th Congress of the European Society for Photobiology, Barcelona, Spain, 25-30 August, 2019, Előadás)

További OWLS-, abszorpciókinetikai és Z-scan méréseink alapján a látható színek tartományhoz tartozó több hullámhosszon meghatároztuk a bakteriorodopszin- és fotoaktív sárga fehérje-alapú – és minimális ballasztanyagot tartalmazó – optikai minőségű filmek törésmutatóit (n_0), lineáris törésmutató-változásainak (Δn) maximális értékét, illetve a nemlineáris törésmutatókat (n_2). Utóbbiak meghatározásához új elvi megközelítést alkalmaztunk a Z-scanes mérések kiértékelése során, ami lehetővé teszi a Kerr-anyagok n_2 értékének a korábbiaknál lényegesen pontosabb meghatározását. A konkrét mérési eredményeket az egyes fehérjék fotociklusai alapján értelmeztük, és megállapítottuk, hogy a fehérjefilmek Δn értékei összemérhetőek az alkalmazások szempontjából legjobbnak tartott nemlineáris optikai anyagok hasonló adataival, az n_2 -re kapott értékek pedig – mindkét fehérje esetében – több nagyságrenddel felülmúlják azokéit. Fikobiliproteinekből készült filmekben is végeztünk méréseket, azonban ebben az esetben az n_0 értékeknek az adott hullámhosszon történő meghatározása a minta erős abszorpciója miatt technikai nehézségbe ütközött. Ezzel együtt, kísérleteink igazolták a fehérje-alapú filmek különleges nemlineáris optikai tulajdonságaival kapcsolatos előzetes várakozásainkat.

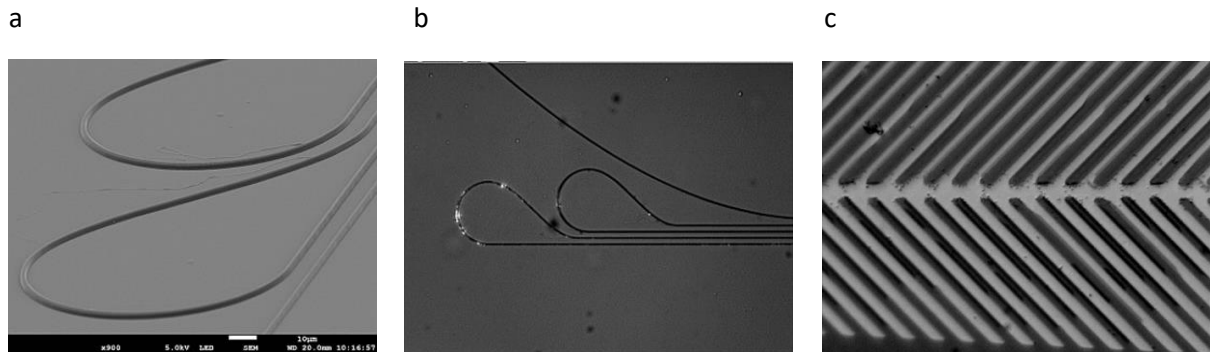
(Publikáció: Krekic S, Zakar T, Gombos Z, Valkai S, Mero M, Zimányi L, Heiner Z and Dér A (2020) Nonlinear Optical Investigation of Microbial Chromoproteins. *Front. Plant Sci.* 11:547818. doi: 10.3389/fpls.2020.547818)

Elektromos térben orientált, bakteriorodopszin-tartalmú bíbormembrán filmekben végzett fotoelektromos mérések segítségével megmutattuk, hogy a membrán válasza a fényindukált gyors töltésszétválasztásra erősen nemlineáris jellegű, aminek gyakorlati jelentőségét diszkutáltuk.

(Publikáció: HIA Mostafa, R Tóth-Boconádi, L Dér, L Fábrián, SG Taneva, A Dér, L keszthelyi (2022) Nonlinear electric response of the diffuse double layer to an abrupt charge displacement inside a biological membrane. *Bioelectrochemistry* 146, 108138)

Passzív integrált optikai (IO) és elektromos struktúrák készítése

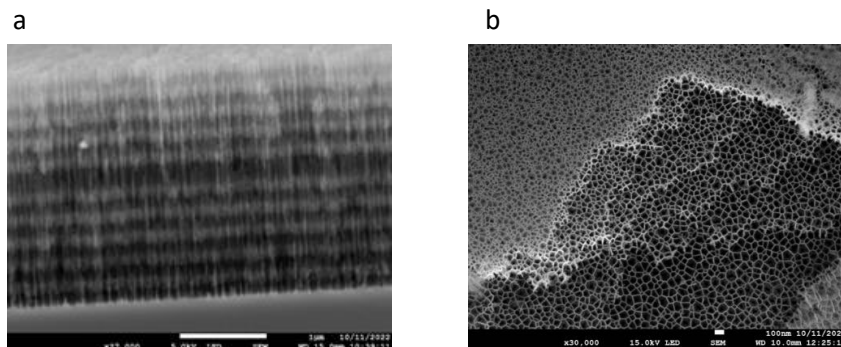
Új típusú integrált optikai struktúrákat (szerpentin- illetve bifiláris spirál karú Mach-Zehnder interferométereket) terveztünk, illetve validáltunk hullámoptikai számolások segítségével, majd direkt lézerírási technikával meg is valósítottuk őket (1. a,b ábra). A struktúrákat pásztázó elektronmikroszkópos topológiai ellenőrző vizsgálatnak vetettük alá, majd egy részüket további vizsgálatok céljából bakteriorodopszinnal funkcionálisztuk.



1. ábra. a) Szerpentin hullámvezető-struktúra elektronmikroszkópos illetve b) fénymikroszkópos képe; c) a felületre integrált dielektroforetikus fókuszáló elektródarendszer képe.

A bioszenzorikai alkalmazásokhoz a hullámvezető struktúra mellé elektródarendszert integráltunk. A struktúra kialakításához a - litográfia mellett – ún. „lift-off” technitát használtunk, az elektródákat pedig katódporlasztással alakítottuk ki az üveghordozó felületén (1. c ábra).

Beüzemeltük az integrált optikai porózus szilícium-struktúrák elektrolitikus maratás segítségével előállító kísérleti berendezésünket is, és sikeresen hoztunk létre váltakozó törésmutatójú vékonyrétegeből álló dielektrikum-tükröket (2. ábra).



2. ábra. Elektrolitikus maratással készített porózusszilícium-mikrokavitás oldalnézeti (a) és felülnézeti (b) képe, a rétegszerkezet megmutatásával

A fenti struktúrákat – biofunkcionalizálás után – fotonikai kapcsolós illetve szenzorikai kísérletekben használtuk fel.

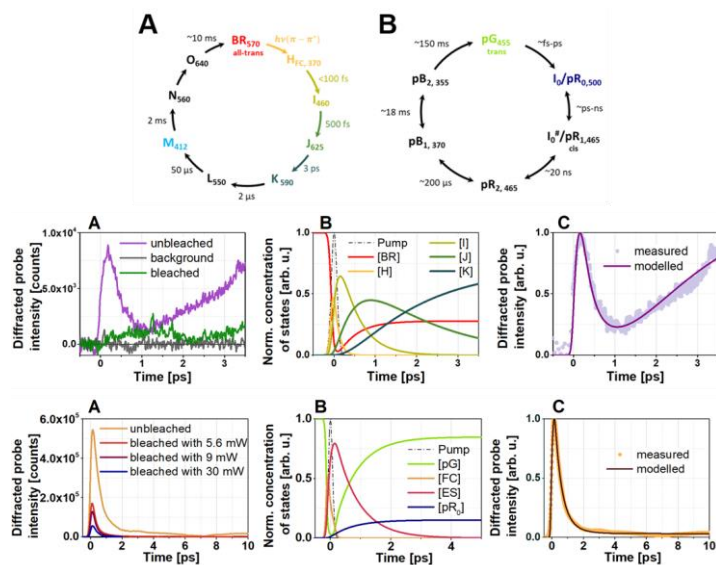
Fotonikai alkalmazások

Optikai kapcsolat

Üvegszubsztráton létrehozott vékony fotoreziszt rétegből – közvetlen lézerírási technikával - integrált optikai Mach-Zehnder interferométert készítettünk, majd ezt fotoaktív sárga fehérje (PYP-) alapú fedőréteggel funkcionálisztuk. Megmutattuk, hogy a PYP-film kedvező nemlineáris optikai

tulajdonságait felhasználva teljesen optikai úton működő fénykapcsolás érhető el, hasonlóan ahhoz, amit bakteriorodopszin (bR-) filmekben korábban demonstráltunk. Megállapítottuk, hogy a PYP fotociklusa elvi lehetőséget nyújt ultragyors (szubpikoszekundumos) fotonikai kapcsolás megvalósítására is, ami az eredmények gyakorlati felhasználási lehetőségeit veti előre. A PYP előnye, hogy - szolubilis fehérje lévén – jóval cizellátabb szerkezetű rétegekbe is beépíthető, mint a membránfehérjeként funkcionáló bR, ezért porózusszilícium-alapú fotonikus struktúrákkal történő kombinációjára is lehetőség nyílik. (Publikáció: Dániel Petrovszki, Szilvia Krekic, Sándor Valkai, Zsuzsanna Heiner, András Dér: All-Optical Switching Demonstrated with Photoactive Yellow Protein Films. Biosensors 2021, 11, 432. <https://doi.org/10.3390/bios11110432>.)

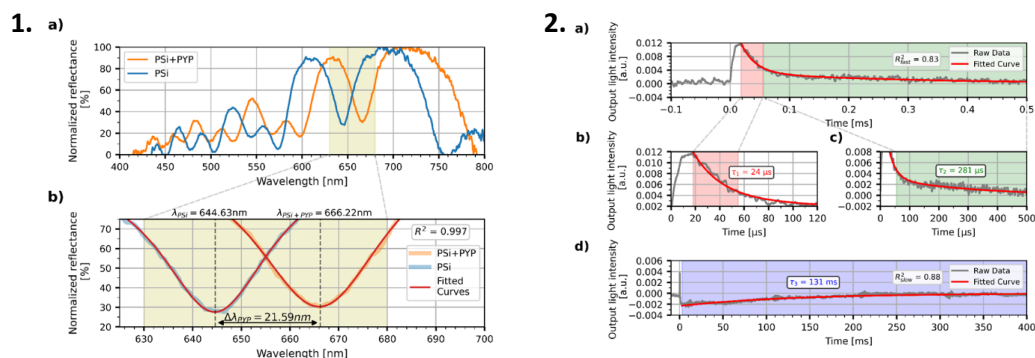
Az ultragyors fotonikus kapcsolás kimutatására – szubpikoszekundumos gerjesztésű tranziens rácson technikával - sikeres kísérleteket hajtottunk végre (3. ábra).



3. ábra. Fent: A bR (A) és a PYP (B) fotociklus-modellje az intermedier állapotokkal. Középen illetve lent: bR- illetve PYP- biofilmekben femtoszekundumos gerjesztéssel létrehozott tranziens holografikus rácson történő fényelhajlás segítségével létrehozott, „routing”-típusú optikai kapcsolást demonstráló tranziens jelek (A). (B) A fotociklus séma alapján számolt koncentráció-változások, illetve ezek illesztése a diffrakciós jelekre (C).

(Publikáció: S Krekic, M Mero, A Der, Z Heiner (2023). Ultrafast all-optical switching using doped chromoprotein films. J. Phs. Chem. C, közlésre elfogadva)

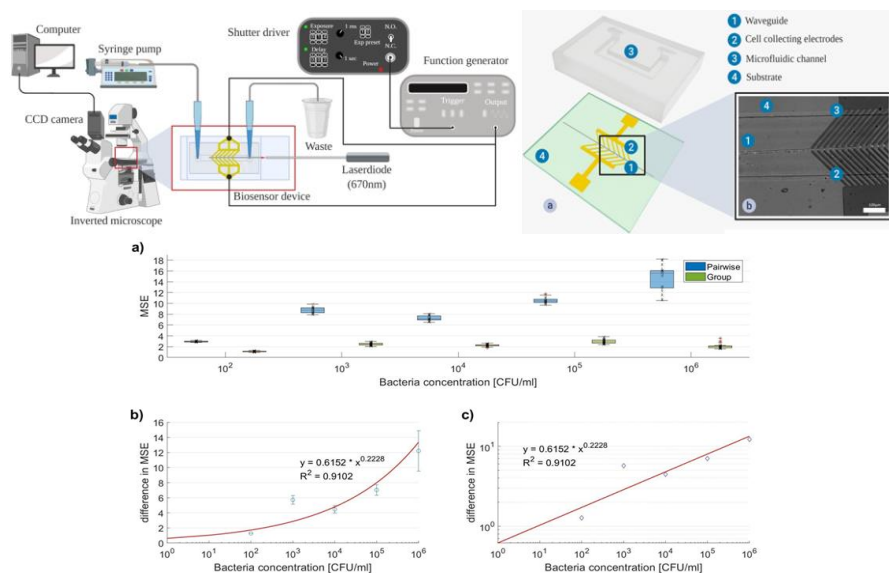
Kihaszználva a PYP fehérje relatíve kis méretét és vízdékonyságát, a porózus szilíciumból készített mikrokavitásokat PYP oldattal impregnáltuk, majd a biofunkcionalizálás után leszárítotva, nemlineáris optikai tulajdonságokkal rendelkező mintát hoztunk létre .



4. ábra. A rezonanciacsúcs biofunkcionalizálás hatására történő eltolódása (1.a,b). A fényindukált reflexióváltozás kinetikája 675 nm-es mérőfényvel detektálva (2.a-d).

Szenzorika

Célkitűzéseink között szerepelt az általunk előállított integrált optikai struktúrák szenzorikai felhasználása is. A fotopolimer hullámvezető struktúrákról megmutattuk, hogy – megfelelő funkcionálizálás után, valamint opcionálisan mikroelektroda-rendszerrel kombinálva - érzékeny bioszenzorok funkcionális elemeiként is hasznosíthatóak, amennyiben alkalmasak a hullámvezető felületére kitapadt analitikus kimutatására. Ennek szellemében olyan bioszenzort készítettünk, aminek működése a hullámvezetőben terjedő fény evanescens teréből eredő szórás jelenség képi detektálásán alapul. A hullámvezető közelében fókuszáló mikroelektroda-rendszert hoztunk létre az üvegszubsztrát felületén, amely a kimutatni kívánt mikron-méretű objektumokat a hullámvezető felületére gyűjtötte. Az eszközt *E. coli* baktériumok szuszpenzióján teszteltük, és megállapítottuk, hogy az alkalmas a baktériumok igen érzékeny, jelölésmentes kimutatására. A bioszenzor alsó kimutatási határa jelenleg 10^3 CFU/ml, ami pl. enyhe húgyúti fertőzések esetén a vizeletben előforduló baktériumkoncentráció jellemző értéke, ezért az eszköz gyakorlati felhasználása is lehetséges. (Publikáció: Dániel Petrovszki, Sándor Valkai, Evelin Gora, Martin Tanner, Anita Bányai, Péter Fürjes, András Dér: An integrated electro-optical biosensor system for rapid, low-cost detection of bacteria. *Microelectronic Engineering* 2021, 239-240, <https://doi.org/10.1016/j.mee.2021.111523>.)



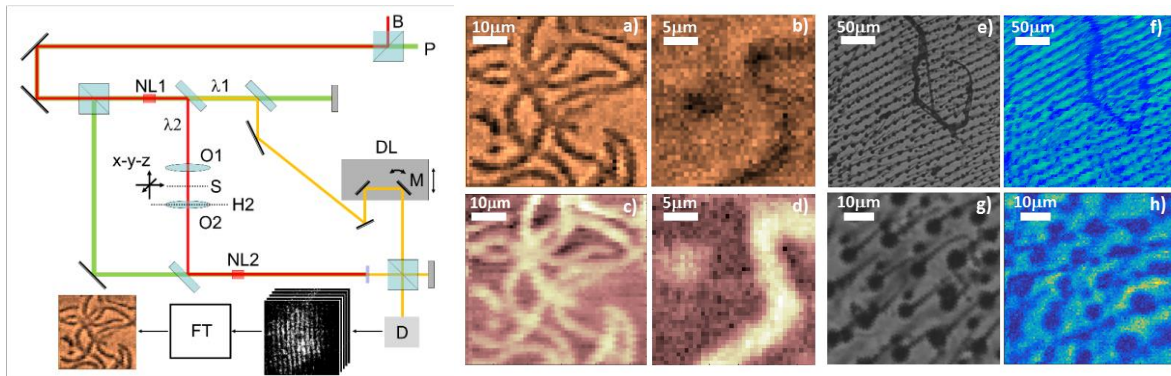
5. ábra. Fent: a mérési elrendezés, illetve az integrált elektro-optikai modul sémája, a dielektroforetikus fókuszáló elektródák, valamint a közük polimerizált hullámvezető struktúra nagyított fényképe. Középen és lent: a baktériumok kirakódásának hatására mérhető fényszórás-differenciák ábrázolása a baktérium-koncentráció függvényében.

Integrált optikai bioszenzorunk továbbfejlesztett változatát ezután chiplaboratóriumi biológiai gátmodellekkel kombináltuk, és kimutattuk, hogy a COVID-tüskefehérje képes átjutni a vér-agy-gát rendszeren, és kisebb mértékben a bélhám-rendszeren is.

(Publikáció: Dániel Petrovszki, Fruzsina R Walter, Judit P Vigh, Anna Kocsis, Sándor Valkai, Mária A Deli, András Dér (2022) Penetration of the SARS-CoV-2 Spike Protein across the Blood–Brain Barrier, as Revealed by a Combination of a Human Cell Culture Model System and Optical Biosensing. *Biomedicines* 10 (1), 188)

A kvantumösszefonódás jelenségét hasznosító optikai kísérletek

Az általunk nemrégiben megépített, kvantumösszefonódást hasznosító leképező rendszert először olyan módon alakítottuk át, hogy felbontóképességét - a pásztázó mikroszkópok elvét használva - jelentősen (kb. 1 nagyságrenddel) megjavítottuk, ami reményeink szerint lehetővé teszi a módszer speciális biológiai mikroszkópiai alkalmazását (pl. biológiai szövetek angiográfiai vizsgálatát a rövid hullámhosszú infravörös – SWIR – tartományban). Az eredményekről a Tudomány Ünnepe keretében, az MTA-székházban megrendezett előadóülésen számoltunk be. (Dér A.: Microscopy with undetected photons, 2018.)



6. ábra. Balra: A mérési elrendezés vázlatja a lézernyalábokkal, optikai elemekkel, mintával (S), a nemlineáris kristályokkal (PPKTP), illetve a detektorral (D). Jobbra: A pásztázó mikroszkópiás rendszerünkkel regisztrált képek különböző felbontásokkal Spirulina algákról (a,b: amplitúdó, illetve c,d: fáziskép), valamint darázs szárnyról (amplitúdókép). Normál fénymikroszkópos referenciakép.

A kapott eredményeket (darázs szárny illetve algák leképezése a hullámhosszhoz közeli felbontással) kvantummechanikai leírás segítségével értelmeztük (ld. az alábbi publikáció „Supplemental Information” szekcióját). A kísérleti adatoknak – pontosabban a detektált interferenciacsíkok különböző tárgy-transzparanciák esetén észlelt láthatóságainak – e leírás felhasználásával történt kiértékelése azt mutatta, hogy az általunk alkalmazott intenzitásvizonyok mellett a tisztán kvantumos illetve klasszikus interferencia közötti átmenet valósult meg, ami a mérés folyamán használt segédlézernyaláb intenzitásával hangolható a két extrém eset között.

(Publikáció: András Búzás, Elmar K Wolff, Mihály G Benedict, Pál Ormos, András Dér (2020) Biological Microscopy with Undetected Photons. IEEE Access 8:107539 – 107548. doi: 10.1109/ACCESS.2020.3000740)

A kísérleti elrendezés további átalakítása optikai kapcsolóhatás demonstrálására folyamatban van.

KITEKINTÉS

Összességében elmondható, hogy sikerült a tudományterületünk élvonalához sorolható eredményeket elérnünk, amelyek megalapozhatják a biofotonikai eszközök szélesebb körű alkalmazását, és az integrált optikai technológiák fejlődésében is új távlatokat nyithatnak.

Természetesen mi is szeretnénk folytatni a megkezdett munkát, akár nemzetközi együttműködésben is. Erre jó esély kínálkozik, miután két helyről is megresesést kaptunk együttműködés folytatására a kvantumösszefonódásos mikroszkópia illetve fotonikai kapcsolás témájában. Egyrészt prof. Branislav Jelenkovictól (Photonics Center, Institute of Physics, University of Belgrade & FSU Jena) kaptunk meghívást egy Horizon EU-projekthez történő csatlakozásra a következő évre, másrészt Prof. Miroslav

Kloz (ELI Beamlines, Prague) és kollégái látogatták meg a laborunkat 2022 októberében, akikkel közös kísérletek elvégzésében állapodtunk meg.

Ezen kívül törekszünk a projekt során elért eredmények gyakorlati hasznosítási lehetőségeinek feltárására is, amihez jó kiindulási alapot jelentenek a fotonikus kapcsolási illetve szenzorikai témában benyújtott korábbi szabadalmaink. Ennek érdekében a 77 Elektronika Kft. munkatársaival egyeztetéseket folytatunk a szenzorikai fejlesztésünk lehetséges felhasználására vonatkozóan.