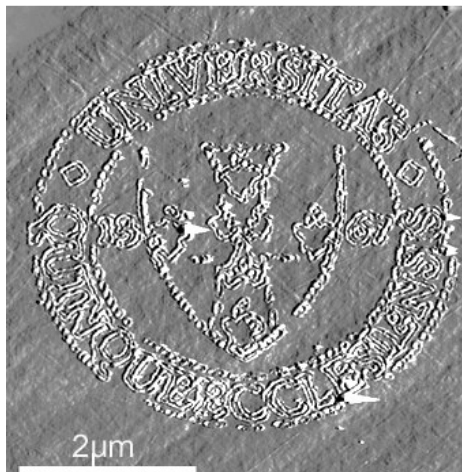


AMYLOID BÉTA-FIBRILLUMOK MORFOLÓGIAI ÉS NANOMECHANIKAI VIZSGÁLATA ATOMERŐ- MIKROSKÓPPAL

Dr. Karsai Árpád



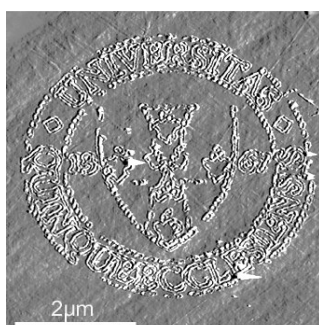
**Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Biofizikai Intézet**

2008

AMYLOID BÉTA-FIBRILLUMOK MORFOLÓGIAI ÉS NANOMECHANIKAI VIZSGÁLATA ATOMERŐ- MIKROSKÓPPAL

Dr. Karsai Árpád

Program:	Biokémia és molekuléris biológia
Doktori Program vezetője:	Dr. Sümegi Balázs
Alprogram B-130	Funkcionális fehérjedynamika vizsgálata biofizikai módszerekkel
Alprogramvezető:	<u>Dr. Somogyi Béla</u>
	Dr. Nyitrai Miklós
Témavezető	ifj. Dr. Kellermayer Miklós



Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Biofizikai Intézet

BEVEZETÉS

Az Alzheimer-kór súlyos neurodegeneratív megbetegedés, melyet Alois Alzheimer írt le 1907-ben. A kórképre jellemző a kognitív és memória funkciók progresszív romlása, neuropszichiátriai és viselkedési zavarok, és a mindennapi életvitel jelentős minőségi leromlása. Az Alzheimer-kór incidenciája az életkor előrehaladtával progresszíven nő. A hetvenöt éven túli korcsoportban előfordulása eléri a 15%-ot. Ha figyelembe vesszük, hogy a fejlett országokra az átlagéletkor fokozatos növekedése, valamint a populáció előregedése jellemző, érthetővé válik, hogy a kórkép, az érintett betegeken túl, nagy terheket ró a társadalomra is. A helyzetet súlyosbítja az a tény, hogy az elmúlt évtizedek kutatásai ellenére hatásos gyógymód nem áll rendelkezésünkre a már kialakult kórkép gyógyítására, a betegség progressziójának megállítására, vagy a kórkép kialakulásának megelőzésére. Ezen okok miatt egyre nagyobb figyelem irányul az Alzheimer-kór jobb megértésére.

Az Alzheimer-kórban egy transzmembrán fehérje, az amyloid prekursor protein (APP) 39-43 aminosavból álló proteolitikus hasítási termékeiből, az amyloid- β ($A\beta$) peptidekből felépülő, oldhatatlan aggregátumok, úgynevezett amyloid plakkok alakulnak ki és rakódnak le a központi idegrendszer extracelluláris térrészeiben. Az $A\beta$ -peptidek keletkezése önmagában fiziológiás folyamat, de normál körülmények között a peptidek nem mutatnak aggregációs hajlamot. Alzheimer-kórban, eddig nem tisztázott okok miatt, a peptidek másodlagos szerkezete megváltozik. Ebben a tévesen, avagy kórosan tekeredett (misfolded) állapotban megnő a peptidek aggregációs hajlama, és felszaporodásukkal amyloid plakkokat hoznak létre a központi idegrendszerben.

Az amyloid plakkok elsősorban a hippocampus és az amygdala területén valamint a frontális, temporális és parietális lebenyben figyelhetők meg. A plakkok megjelenésével párhuzamosan progrediáló idegsejt elhalás is zajlik, mely idővel makroszkóposan is kimutatható agyi atrófiához vezet. Az amyloid plakkok fő komponensei tehát az amyloid β ($A\beta$) -fibrillumok, $A\beta$ -peptidekből felépülő szigorúan rendezett szerkezetű struktúrák, melyeket a plakkok központi részében helyezkednek el, körbevéve disztrófikus dentritekkel és axonokkal, valamint reaktív astrocitákkal és aktivált microglia sejtekkel. Emellett fellép egy markáns, intracellulárisan megjelenő patológiás elváltozás, a neurofibrilláris kötegek megjelenése a neuronok sejttestjeiben, melynek hátterében a tau mikrotubulus kötő fehérje hiperfoszforilációja és aggregációja áll.

Mivel az $A\beta$ -fibrillumok jelenléte, illetve mennyisége korrelációt mutat a kórkép súlyosságával, élénk figyelem irányul az $A\beta$ -fibrillumok szerkezetének valamint a

fibrillogenezis mechanizmusainak pontosabb megértésére. Ugyanakkor jelenleg sem tisztázott teljes mértékben, hogy az abnormális térszerkezetet felvett A β -peptidek aggregációja áll-e elsődlegesen a neuronpusztulás és így az Alzheimer-kór kialakulásának hátterében, vagy egyéb, az A β -fibrillumok és amyloid plakkok megjelenésével párhuzamosan zajló folyamat. Egyre több bizonyíték mutat arra, hogy maguk az amyloid plakkok rezervoárként szolgálnak olyan A β -oligomerek számára, melyek direkt neurotoxikus tulajdonságokkal rendelkeznek.

Túl az Alzheimer-kór orvosi biológiai jelentőségén az A β -fibrillumok fizikokémiai- és önszervező tulajdonságai lehetővé teszik, hogy modellként szolgáljanak peptid alapú, önfelépítő struktúrák létrehozásához és vizsgálatához, melyek nanotechnológiai szempontból is értékes, az alap kutatáson túlmutató gyakorlati alkalmazási lehetőségeket rejthetnek magukban.

VIZSGÁLÓ MÓDSZEREK

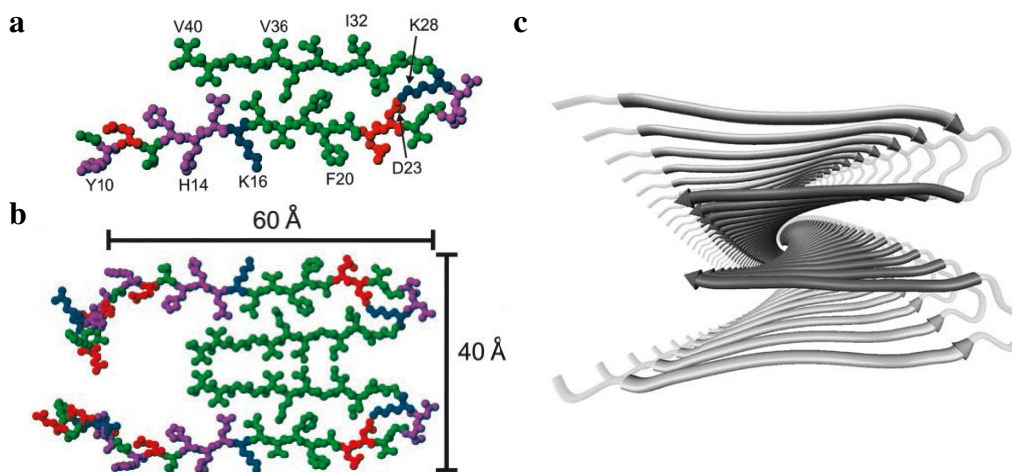
Az első szerkezeti információk röntgendiffrakciós mérésekből származnak. A mérések tanúsága szerint az A β -fibrillumokra és egyben minden más típusú amyloidra jellemző egy sajátos diffrakciós mintázat, mely arra utal, hogy a fibrillumok nagy fokban rendezett, β -lemez szerkezetű monomerekből felépülő struktúrák. Morfológiai szempontból elektronmikroszkópos, illetve későbbiekben atomerő-mikroszkópos (AFM) és más pásztázó próba mikroszkópos megfigyelések gazdagították a rendelkezésünkre álló tudást. Lényegében ezen vizsgálómódszerek, valamint kémiai festési eljárások eredményeiből született meg az amyloid empirikus definíciója. Jelenleg amyloidnak tekinthető az a peptid vagy fehérje asszociátum, mely 1) mutatja a karakterisztikus röntgen diffrakciós mintázatot (később kerül részletesebb tárgyalásra) 2) nem elágazó fibrilláris struktúrákat alkot, 3) pozitív reakciót ad bizonyos festékmolekulákkal, melyek közül a Thioflavin-T és a Congo-vörös a legfontosabb.

Hagyományos szerkezet-meghatározó módszerekkel nem sikerül közelebb jutni az amyloid fibrillumok pontos szerkezetének megismeréséhez. Ennek oka, hogy a felépülő fibrillumok és belőlük kialakuló aggregátumok vízben oldhatatlanok. Tovább nehezíti a helyzetet az a tény, hogy az A β -peptidek nem kristályosíthatók.

AZ EGYES A β -FIBRILLUMOK FELTÉTELEZETT SZERKEZETE

Az Alzheimer-kórban döntően kétféle A β -peptidből képződnek A β -fibrillumok: A β 1-40 és A β 1-42. Bár a két peptid csupán két aminosavban különbözik egymástól, mind szerkezetükben és mind tulajdonságaikban igen eltérő fibrillumokat alakítanak ki.

A jelenleg elfogadott modell szerint A β 1-40 fibrillumok esetében β -szál – kanyar – β -szál (más néven β - β -ív (Efimov, 1987)) szerkezetű monomerek sorakoznak a fibrillum hossz tengelyére merőlegesen és alakítanak ki két β -lemezt. A β - β ív szerkezetet egy a D23 és K28 aminosavak oldalláncai közt kialakuló só-híd stabilizálja (1. ábra). Két, helikálisan egymásba csavarodó β -lemez duplex alakít ki egy protofilamentumot. Több, a fibrillum hossz tengelyében egymással párhuzamosan futó protofilamentum alakítja ki az ugyancsak helikális szerkezetű fibrillumot.

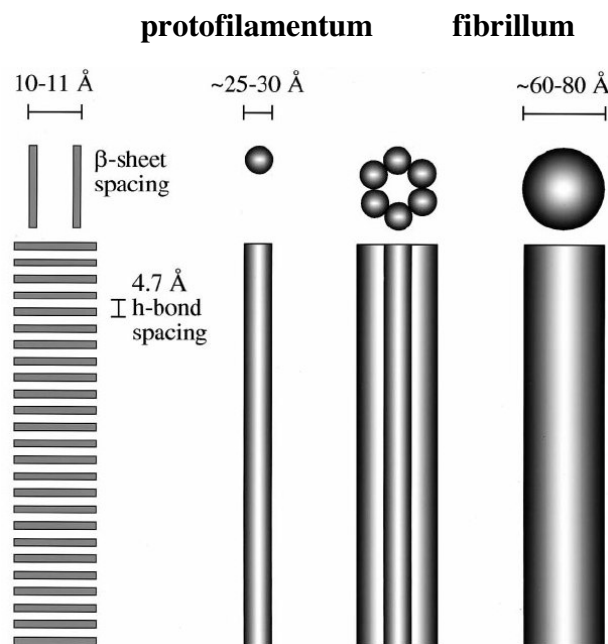


1. Ábra. Az A β 1-40 protofilamentum szerkezeti modellje. **a.** A β 1-40 peptid protofilamentumon belüli szerkezetének modellje (zöld: hidrofób oldallánc, piros: savas oldallánc, lila: bázikus oldallánc, kék: hidrofil oldallánc). Nyilak jelölik a peptid szerkezetét stabilizáló só-hidat. **b.** A β 1-40 peptidek által kialakított duplex szerkezeti modellje **c.** A helikális szerkezetű protofilamentum modellje.

Egy a közelmúltban A β 1-42-es fibrillumokról megjelent munka szerint a β - β -ívet intermolekuláris és nem intramolekuláris kölcsönhatások stabilizálják. Ebben a modellben egyetlen β -lemez duplex alakít ki egy protofilamentumot. Az A β -protofilamentumok egymással párhuzamosan rendeződve építik fel a 4-8 nm vastag helikális A β 1-42 fibrillumot.

Az érett fibrillumokra általánosan igaz, hogy rendezett szerkezetű, egyenes lefutású vagy helikális, el nem ágazódó struktúrák. Jellemző rájuk, hogy röntgen diffrakciós mintázatokon egy a fibrillum hossz tengelyére merőleges 4,7 Å valamint a hossz tengellyel párhuzamos 10,7 Å ismétlődést reprezentáló reflexió figyelhető meg. A 4,7 Å távolság megfelel az egyes β -lemez konformációjú monomerek közötti hidrogén híd távolságnak, míg a 10,7 Å megfelel a fibrillum hossz tengelyére merőlegesen elhelyezkedő β -lemezek oldalláncai közötti távolsággal.

A hidrogén hidakkal összekapcsolódó β -peptidek alakítják ki a fibrillumok hossz tengelyében futó protofilamentumokat (2. ábra), melyeket ma a fibrillumok szerkezeti alapegységeinek tekintünk.



2. Ábra. Az A β -fibrillumok szerkezetére jellemző a hierarchikus szerveződés.

EGYEDI FIBRILLUMOK VIZSGÁLATA ATOMERŐ-MIKROSZKÓPPAL

Az amyloid fibrillumok morfológiájának tanulmányozásában az AFM egy, egyre szélesebb körben használt, igen informatív vizsgálóeljárás. A mikroszkóp egy flexibilis rugólapon elhelyezkedő nanométeres végátmérőjű tűvel pásztázza le a mintát, topografikus, háromdimenziós, azaz magasság információt is tartalmazó képeket hozva létre.

Legfőbb előnye más mikroszkópos technikákkal szemben, hogy alkalmas biológiai minták natív szerkezetének vizsgálatára, fizioiógias vagy fizioiógias körülményeket modellező kondíciók közt. Az AFM elvileg szubnanométeres, tipikus esetben 1-5 nanométeres részletek elkülönítésére ad lehetőséget, mely lehetővé teszi, hogy az amyloid minták a fibrillogenezis bármely stádiumában vizsgálhatók legyenek.

Lehetőség van arra, hogy egymást követő pásztázások sorozatát elkészítve, az idő függvényében kövessük nyomon a mintában végbemenő morfológiai változásokat. Bár az AFM időbeli felbontása messze elmarad a fénymikroszkópos technikáktól, az átlagosan 2-4 perc alatt rögzített felvételekből összeállított képek sorozatai így is bepillantást engednek a fibrillum formálódás folyamatába, lehetővé téve a morfológiai változások időbeli követését akár egyetlen amyloid fibrillum esetében is. Így olyan jelenségek is megfigyelhetők, melyek molekulasokaságokon végzett kísérletek esetében kiátlagolódnának.

PEPTID ALAPÚ NANO-VEZETÉK HÁLÓZATOK

Az amyloid peptidek kedvező fizikai-kémiai tulajdonságai elméletileg lehetővé teszik, hogy építőegységei lehessenek nano-léptékű önszerveződő rendszereknek és szerkezeteknek.

Számos eredmény bizonyítja az amyloid alapú nano-skálájú struktúrák relevanciáját és elvi működőképességét. Élesztő sejtekben expresszálandó Sup35 fehérje N-terminális és középső, úgynevezett NM régiójának genetikai módosításával sikerült létrehozni olyan amyloid fibrillumokat, melyek egy cisztein SH csoportján keresztül képesek kolloidális arany partikulumok megkötésére, bizonyítva, hogy a célzott módosításokkal új tulajdonságokkal ruházhatók fel amyloid képzésre alkalmas fehérjék, anélkül, hogy alapvető tulajdonságaikat elveszítenék.

A β 1-42 rendezett, hexagonálisan mintázott mutató hálózatot képes kialakítani grafit (HOPG) felszínen. Alfa-synuclein esetében hasonló elrendeződést figyeltek meg csillám felszínen.

A rendezett, megjósolható szerkezetű, valamint szabályozható hálózatok létrehozása kulcsfontosságú a célzott alkalmazhatóság szempontjából.

CÉLKITŰZÉSEK

Kísérleteink során az A β -fibrillumok szerkezeti dinamikáját, mechanikai stabilitását valamint a fibrillogenezis folyamatát terveztük tanulmányozni nanobiotechnológiai módszerekkel.

1. Munkánk során első lépésben szintetikus úton előállított különböző A β -peptidekből (A β 1-42, A β 1-40, A β 25-35, A β 25-35_K28Ac, A β 25-35_G25Ac) kívántunk A β -fibrillumokat előállítani, azokról nagy felbontású felvételeket készíteni atomerő-mikroszkóp segítségével, morfológiai vizsgálatok céljából.
2. Egyedi molekula manipulációs technikákkal, AFM segítségével, in-situ erőspektroszkópiás méréseken keresztül tanulmányozni kívántuk az egyes A β -fibrillum variánsok szerkezeti dinamikáját, mechanikai stabilitását.
3. Vizsgálni kívántuk A β 25-35, illetve különböző helyeken acetilált peptidből felépülő A β 25-35 fibrillumok mechanikai stabilitását és csillámfelszínen mutatott káliumfüggő, trigonális orientációját.
4. Pásztázó próba kimográfiával az A β 25-35 és A β 1-42 fibrillumok polimerizációjának követésével kívántuk vizsgálni egyedi fibrillumok növekedési dinamikáját csillám és grafit felszínen.

EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

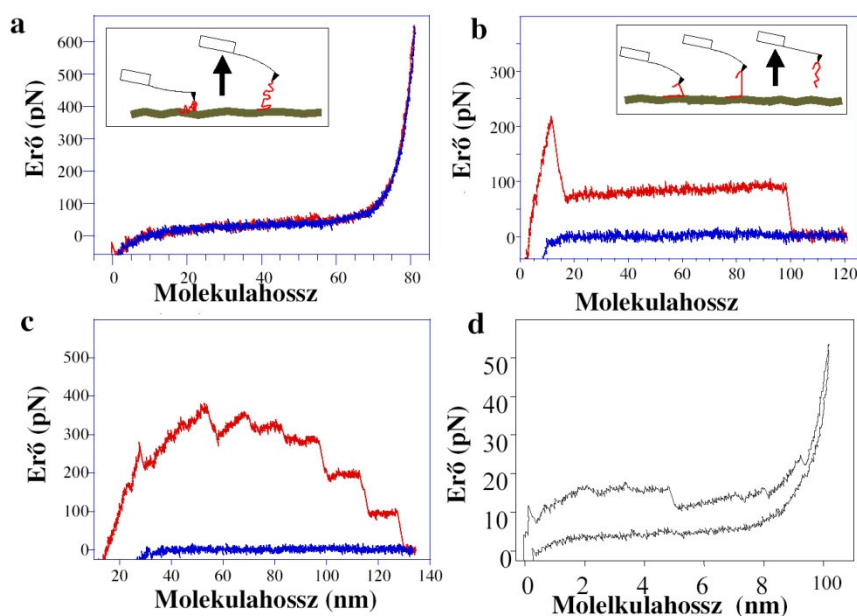
A β -FIBRILLUMOK MORFOLÓGIÁJA ÉS BELSŐ SZERKEZETI DINAMIKÁJA

A β -AMYLOID FIBRILLUMOK ERŐSPEKTROSKÓPIÁJA

Az A β 1-40 fibrillumokon elvégzett erőspektroszkópiás mérések során sikerült első ízben megörökíteni a β -amyloidokra jellemző, karakterisztikus erőválaszokat. Kísérleteinkben kovalens keresztkötővel (GOPS) a felszínhez rögzített amyloid fibrillumokat manipuláltunk mechanikailag AFM segítségével.

A kapott erőgörbék alapján két alapvető, elemi mechanikai választ figyeltünk meg: 1.) nem-lineáris rugalmas választ (3.a ábra) és 2.) erő platót. (3.b ábra)

Gyakran megfigyelhető az elemi mechanikai jelenségek hierarchikus egymásra épülése, például többszörös erő platók formájában (3.c ábra), illetve a nemlineáris rugalmas viselkedés kombinálódása erő platókkal (3.d ábra).



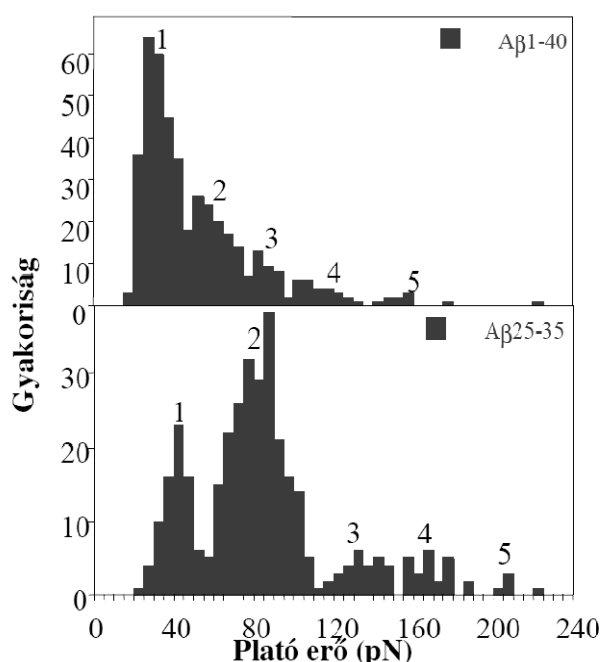
3. Ábra. A β -fibrillumok molekuláris erőspektroszkópiája. **a.** Nem-lineáris rugalmas erőválasz. **b.** Erő plató. **c.** Hierarchikusan egymásra épülő, lépcsőt kialakító erő platók. **d.** Nem-lineáris erőválasz kombinálódása erő platóval. **Betét ábrák:** a kísérleti elrendezést szemléltetik.

A mechanikailag perturbált amyloid fibrillumok esetében megfigyelt erő plató legelfogadhatóbb magyarázata az, hogy a filamentumot felépítő alegységet, azaz egy

protofilamentumot vagy - abban az esetben ha, egy protofilamentumot több β -lemez egység épít fel – egy β -lemez egységet fejtünk le a fibrillum felszínéről. A hierarchikus erő plató azzal magyarázható, hogy több protofilamentumot illetve β -lemez egységet fogunk és húzunk le egy időben a fibrillum felszínéről.

AB-AMYOLID FIBRILLUMOK MECHANIKAI UJJLENYOMATA

Megfigyeléseink szerint az erő platók magassága (“plató erő”) diszkrét eloszlást mutat, melyben a csúcsok egy egységnyi plató erőnél és ennek egész számú többszöröseinél jelentkeznek (4. ábra). Az egységnyi plató erő megfeleltethető az egyetlen protofilamentum lecipzározásához szükséges erővel. Méréseink alapján megállapítottuk, hogy az egységnyi plató erő az A β 1-40 esetében 33 pN, az A β 25-35 esetében 41 pN.

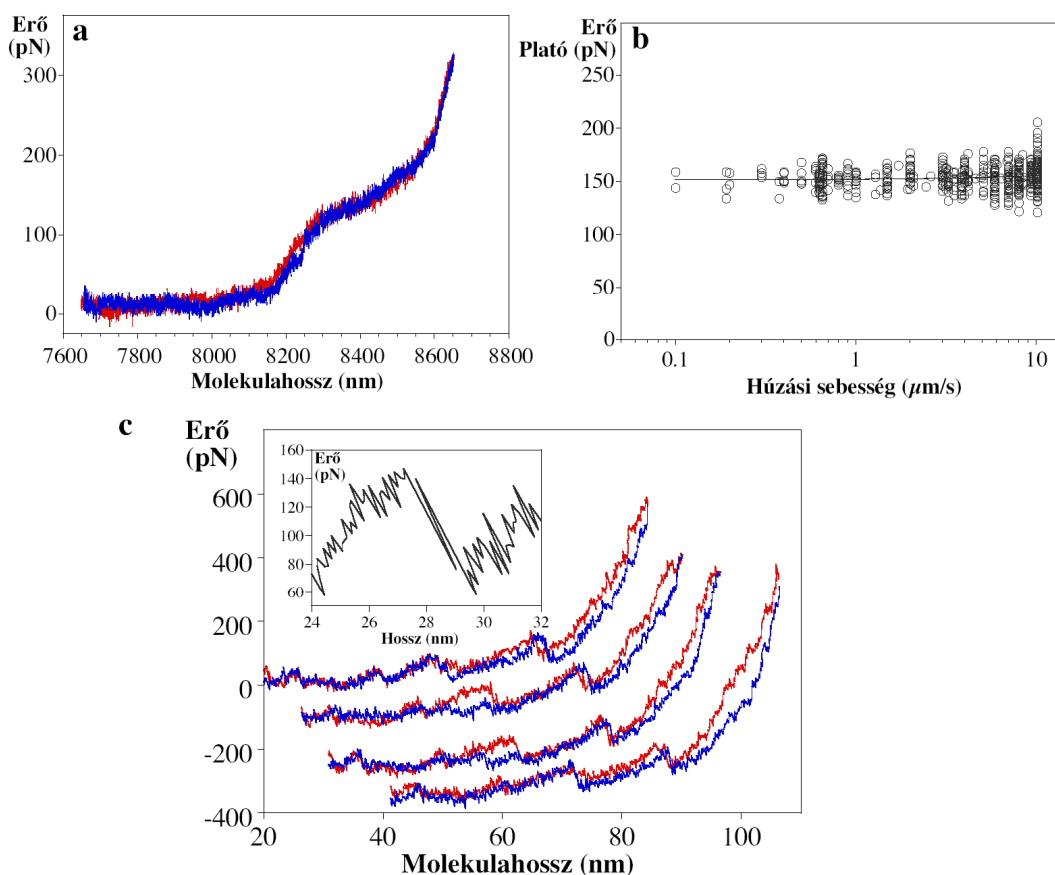


4.Ábra. A plató erő eloszlása A β 1-40 (fent) és A β 25-35 fibrillumok (lent) esetén. A számok a plató átmenetben résztvevő polimerláncok (protofilamentumok) számát jelölik.

Egyik lehetséges magyarázat lehet a különbségre az A β 1-40 és A β 25-35 fibrillumok esetében, a Lys²⁸ reziduum eltérő helyzete és ebből fakadó eltérő szerepe a fibrillumok stabilizálásában. Az A β 1-40 esetében a Lys²⁸ sóhidat alakít ki az Asp²³ reziduummal és így az A β monomer, hajtókanyar szerkezet stabilizálásában vesz részt, míg az A β 25-35 esetében elképzelhető, hogy intrafibrilláris stabilizáló kölcsönhatást alakít ki egy szomszédos protofilamentumban elhelyezkedő monomer Met³⁵ residuumával és így a fibrillum stabilizálásában játszik szerepet.

REVERZIBILIS JELENSÉGEK A FIBRILLUMOK BELSŐ DINAMIKÁJÁBAN

Fontos megfigyelésünk, hogy a szétcipzározódás reverzibilis (5. ábra). Azaz, a lefejtett láncok képesek nagy sebességgel visszakapcsolódni, visszafeküdni a fibrillum felületére (összecipzározódás). Ez abban az esetben válik detektálhatóvá, ha az erőspektroszkópia során lefejtett fibrillum alegység a húzás során nem szakad le a rugólapka tűjéről (vagy a fibrillum felszínéről). Így a visszaengedés folyamán monitorozhatók a rendszer relaxációja alatt bekövetkező erőátmenetek.



5. Ábra. Aβ1-40 fibrillumok reverzibilis és repetitív erőválaszai. **a.** Reverzibilis erő plató, mely esetében a plató egy nem-lineáris elasztikus erőválasszal csatoltan látható. **b.** Plató erők a húzási sebesség függvényében. A plató erőket ugyanazon a fibrillumon mértük egymásután, változó húzási sebesség mellett **c.** Reverzibilis erőátmenetek Aβ1-40 fibrillumok esetében. Az ábra egymást követő húzási ciklusokat mutat. A **betétábrán** jól látható a rendszer két állapota közötti gyors fluktuáció.

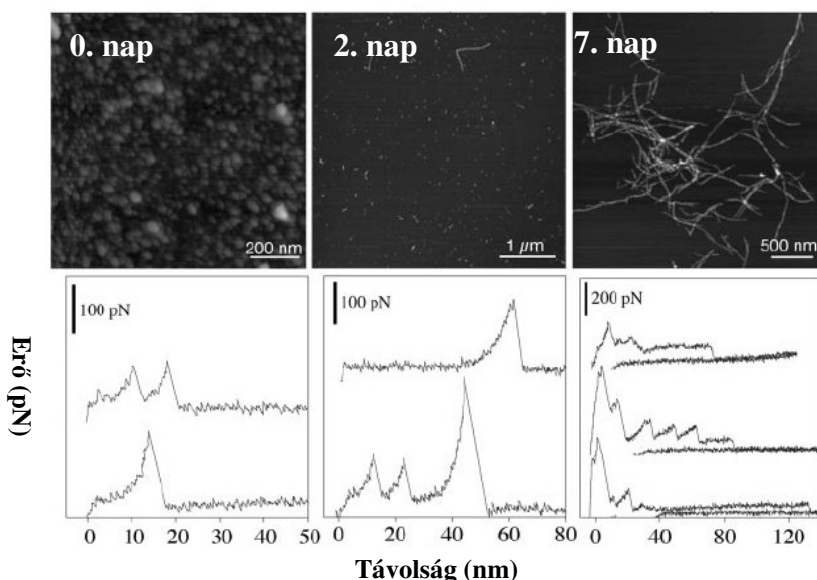
A reverzibilitásnak több megnyilvánulását is tapasztaltuk: 1) Az erő plató mind nyújtáskor, mind visszaengedéskor ugyanazt az elrendeződést mutatta, azaz a molekuláris rendszer ugyanazt az utat járta be mindkét irányú folyamat során. 2) Az erő plató magassága széles húzási sebességtartományban azonos volt, ami arra utal, hogy a reasszociáció lépései rövidebb időskálán zajlanak, mint a húzási kísérlettel kapcsolatos mechanikai lépések. 3)

Repetitív mechanikai ciklusokban, rugalmas viselkedéssel csatolt erő plató esetén ugyancsak tapasztaltunk reverzibilitást, és ilyenkor a rendszer két állapota: közötti, oda-vissza fluktuációt is tapasztaltunk, mely jelzi, hogy dinamikus egyensúlyról van szó.

IN SITU ERŐSPEKTROSKÓPIA

Az A β 1-40 fibrillumokon végzett kísérleteinkben AFM segítségével követtük a fibrillumok kialakulását, illetve morfológiájának változását az inkubációs idő függvényében. A fibrillumok lassú kinetikával alakulnak ki (6. ábra). A peptidek beoldását követő második órában (0. nap), még csupán globuláris alakú aggregátumok figyelhetők meg, melyek átlagos magassága 1 nm, így feltételezhető, hogy ezek a struktúrák a fibrillumképződés kezdeti fázisában lévő peptid oligomerek. A második naptól megjelennek a jellegzetes, el nem ágazódó, változó hosszúságú A β -fibrillumok, melyek magassága 6-8 nm. A további érés során, a hetedik nap után, egyrészt hossz- és magasságnövekedés figyelhető meg. A fibrillumok eléri a több mikrométeres hosszt, másrészt asszociációjukból elkezdenek kialakulni a kevésbé rendezett szerkezetű A β aggregátumok, miközben eltűnnek, az érés korábbi stádiumában lévő entitások.

A lassú kinetikával növvő A β 1-40 mintákat az érés különböző fázisaiban vizsgálva megállapítottuk, hogy a karakterisztikus, plató típusú erőválaszok csak az érett fibrillumokra jellemzők (6. ábra).



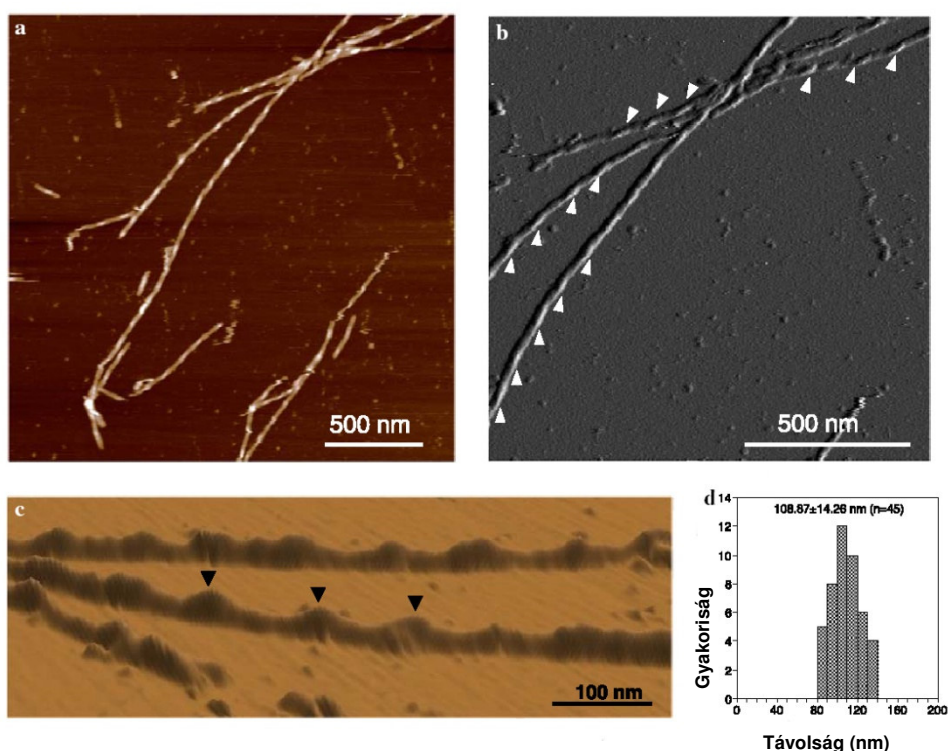
6. Ábra. Felső panel: A β 1-40 fibrillumok AFM morfológiájának változása az idő függvényében. A felvételek oszcillációs üzemmódban, levegőben, csillámfelszínre adszorbeált szárított mintáról készültek. **Alsó panel:** morfológiai megfigyelésekhez használt mintákkal egyidős preparátumok jellegzetes erőspektrumai. A méréseket GOPS aktivált üvegfelületen, kovalensen rögzített fibrillumokon végeztük pufferben.

Megfigyeléseink arra utalnak, hogy az amyloid fibrillumok érésük során belső szerkezeti átalakulásokon mennek keresztül. Számos, mások által elvégzett vizsgálat is arra utal, hogy a protofilamentumok a fibrillumok alegységei, míg a globuláris előalakok és protofibrillumok nem rendelkeznek ilyen jól definiálható szerkezeti alegységekkel. Ezek a megfigyelések összhangban vannak és erősítik azt a feltételezésünket, hogy a mechanikai manipuláció során protofilamentum alegységek deszorpciója történik a fibrillum felszínéről.

AB1-42 FIBRILLUM ATOMERŐ-MIKROSKÓPOS VIZSGÁLATA

AB1-42 FIBRILLUMOK MORFOLÓGIÁJA

AB1-42 fibrillumok morfológiai vizsgálata során megállapítottuk, hogy az általunk vizsgált preparátumokban az fibrillumok hossza eléri a több mikrométert, továbbá balmenetes helikális szerkezetet mutattak (7.a,b,c ábra). Az átlagos fibrillum magasság – mely abban az esetben, ha feltételezzük, hogy az adott struktúra a hossz tengelyére szimmetrikus, atomerő-mikroszkópos felvételek esetén, kis hibával megfeleltethető a fibrillum vastagságával, - $4,77 \pm 1,82$ nm volt.



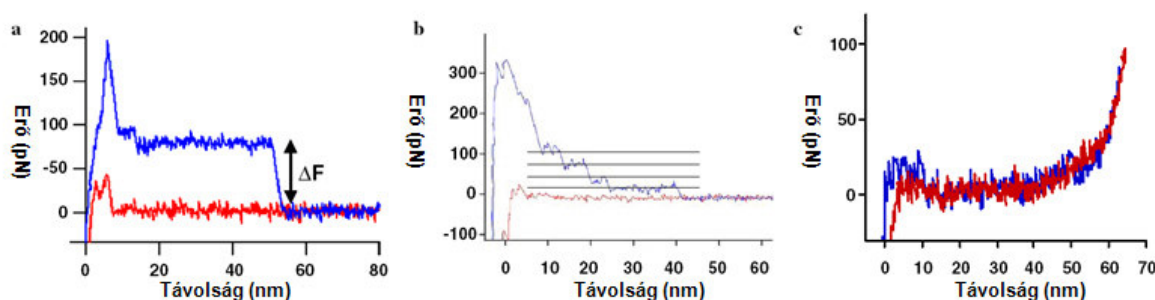
7. Ábra. AB1-42 fibrillumok szerkezeti elemzése. (a) Pásztázó atomerő-mikroszkópos, oszcillációs üzemmódban felvett magasságkontraszt felvétel, csillámfelületre abszorbeált AB1-42 fibrillumokról, pufferben. (b) Amplitúdókontraszt kép, az utóbbi (a) felvétel kinagyított része, melyen jobban kitűnik a fibrillumok balmenetes helikális szerkezete. Nyílhegyek jelzik a helicitás helyét és irányát. (c) Helikális szerkezetű fibrillum 3D rekonstrukciója. Nyílhegyek jelölik a periodikus magassági maximumokat. (d) A hélix periódicitásának hisztogramja

A fibrillumok magasságát elemezve multimodális eloszlást kaptunk, lokális maximumok mutatkoztak ~4, ~6, ~9 és ~12 nm-es fibrillum magasságnál.

AB1-42 FIBRILLUMOK ERŐSPEKTROSKÓPIÁS VIZSGÁLATA

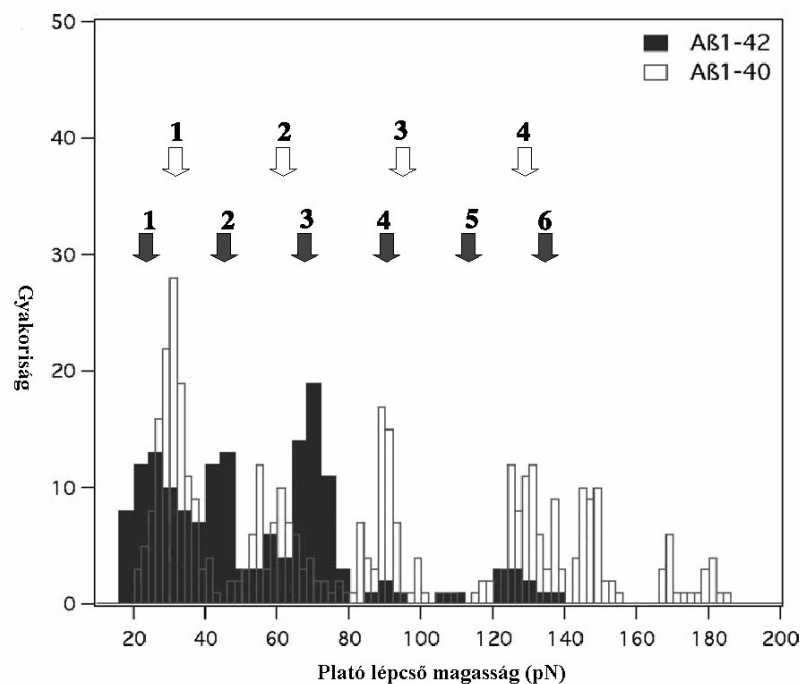
Az AB1-42 fibrillumokon elvégzett erőspektroszkópiás mérések alapján megállapítottuk, hogy hasonlóan a korábban vizsgált A β -fibrillumokhoz, erőválaszok szempontjából az AB1-42 is hasonlóan viselkedik, mint az AB1-40 és AB25-35 fibrillumok.

Erőspektroszkópiás méréseink során két jellegzetes erőválaszt és azok egymásra épülő kombinációit tudtuk elkülöníteni: 1.) erő platókat 2.) nem-lineáris, rugalmas erőválaszt, mely az esetek egy részében reverzibilitást mutatott 3.) és ezek egymásra épülő kombinációját (8. ábra). Valamint az AB1-42 esetében is megfigyeltünk reverzibilis folyamatokat és ismétlődő, egymással lényegében azonos erőgörbéket, egymást követő húzási ciklusok során.



8. Ábra. AB1-42 fibrillumok jellegzetes erőspektrumai. **a.** Reprezentatív erő plató. ΔF jelöli az erő plató magasságát. **b.** Többszörös erő platók, melyek lépcsőszerű elrendezésben. A hirtelen erőesések a lecipzározott protofilamentum, a rugólapka tűjéről történő, egymástól független leszakadásának következményei. **c.** Reverzibilis, nem-lineáris erőválasz.

A paltó erők statisztikai elemzéséből kiderült, hogy az erők nagysága multimodális eloszlást mutat. Az alap plató erő értéke 23 pN nagyságúnak adódott (9. ábra).



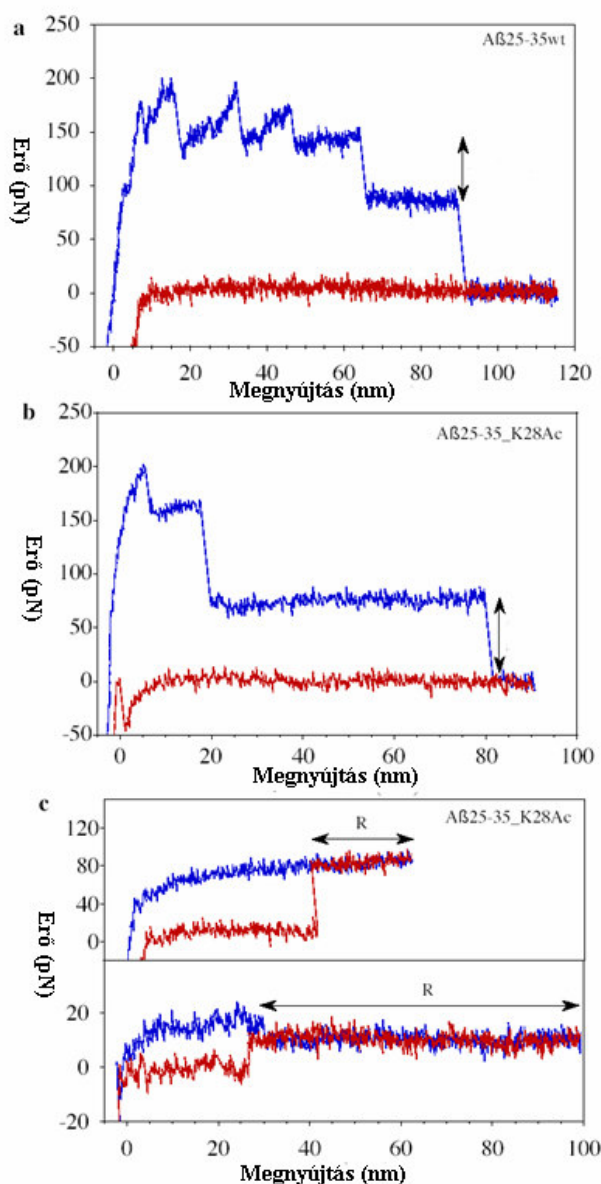
9. Ábra. Az A β 1-42 fibrillumok erőspektrumainak elemzésével kapott plató erő értékek hisztogramja, összevetve az A β 1-40 fibrillumok korábbi mérések során kapott plató erő eloszlásával. Az A β 1-42 esetében az alap plató erő 23 pN nagyságúnak, míg az A β 1-40 esetében 33 pN nagyságúnak adódott.

A hisztogramon az egyes plató erő értékek hat lokális maximumba csoportosulva helyezkednek el. Feltételezhető, hogy az egyes A β 1-42 fibrillumokat változó számú, maximális hat protofilamentum alegység építi fel. Az A β 1-42 és A β 1-40 esetében kapott különböző értékek is utalnak a fibrillumokat összetartó kölcsönhatások különbségére és így a fibrillumok eltérő belső szerkezetére.

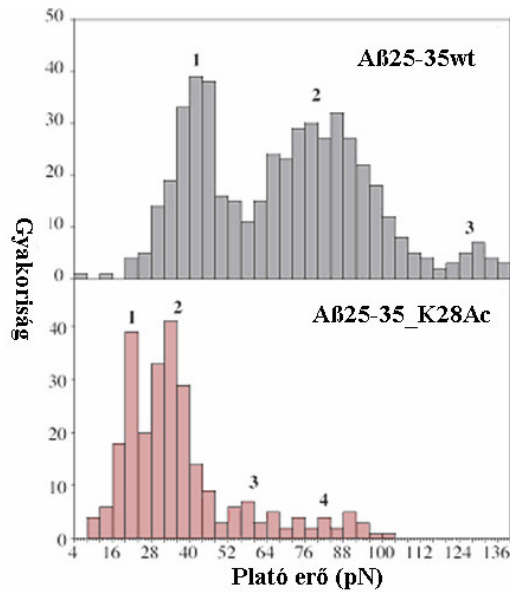
AZ A β 25-35_K28AC FIBRILLUMOK MECHANIKAI STABILITÁSÁNAK VIZSGÁLATA

Az A β 25-35 és A β 25-35_K28Ac fibrillumok összehasonlító erőspektroszkópiás vizsgálatával arra kívántunk fényt deríteni, hogy a Lys²⁸ oldallánc részt vesz-e az A β 25-35 fibrillumok szerkezetének stabilizálásában, és ha igen, milyen mértékben? Feltételezhető ugyanis, hogy a Lys²⁸ oldallánc ϵ -aminocsoportja képes interakcióba lépni egy szomszédos protofilamentumban elhelyezkedő peptid C-terminális Met³⁵ karboxil, illetve az általunk vizsgált fibrillumok esetében a Met³⁵ amid csoportjával. A feltételezések szerint, ennek a kölcsönhatásnak a fibrillumok stabilizálásában lehet szerepe.

Az A β 25-35_K28Ac fibrillumokon elvégzett erőspektroszkópiás vizsgálatokból a következőket állapíthattuk meg: 1.) dominánsan erő plató típusú spektrumokat sikerült regisztrálnunk, melyek protofilamentumok a fibrillum felszínéről történő fokozatos deszorpciójára vezethetők vissza (10.a.b. ábra). 2.) Megfigyeltünk a már korábbiakban más típusú A β amyloid fibrillumok esetében tapasztaltakhoz hasonló, reverzibilis erőátmeneteket, mely a lefejtett protofilamentum gyors visszacipzározódásának a jele. 3.) Az erőspektrumokat elemezve megállapítottuk, hogy plató erők multimodális eloszlást mutatnak, ahol az alap plató erő 22 pN szemben a vad típus esetén mért 41 pN nagysággal (11.ábra) .



10. Ábra. Mechanikai manipulációnak kitett A β 25-35wt azaz vad típusú és A β 25-35_K28Ac fibrillumok típusos erőválaszai. **a.** Erő plató az A β 25-35wt esetében. **b** Erő plató az A β 25-35_K28Ac esetében. A függőleges nyilak a plató erők nagyságát jelölik. **c.** Reverzibilis visszacipzározódást bemutató húzási görbe A β 25-35 Lys28 aminosav ϵ -amino csoportján acetilált peptidekből felépült fibrillum esetében. Az „R” szakaszok a húzási görbe reverzibilis szakaszát jelöli.



11. Ábra. Aβ25-35_K28Ac peptid Lys28 aminosav ε-aminocsoportjának acetilálása hatására a kontrol Aβ25-35wt fibrillumokhoz képest a plató erő lecsökken.

Az eredményekből levonható az a következtetés, hogy az Aβ25-35 peptid Lys²⁸ aminosav ε-aminocsoportjának szerepe lehet a fibrillumok belső szerkezetének stabilizálásában. Továbbá a mechanikai manipulációnak kitett Aβ25-35_K28Ac peptidekből felépült fibrillumok is ugyanazokat a karakterisztikus jelenségek mutatják, mint amiket az Aβ1-40, Aβ1-42 és Aβ25-35 esetében megfigyeltünk.

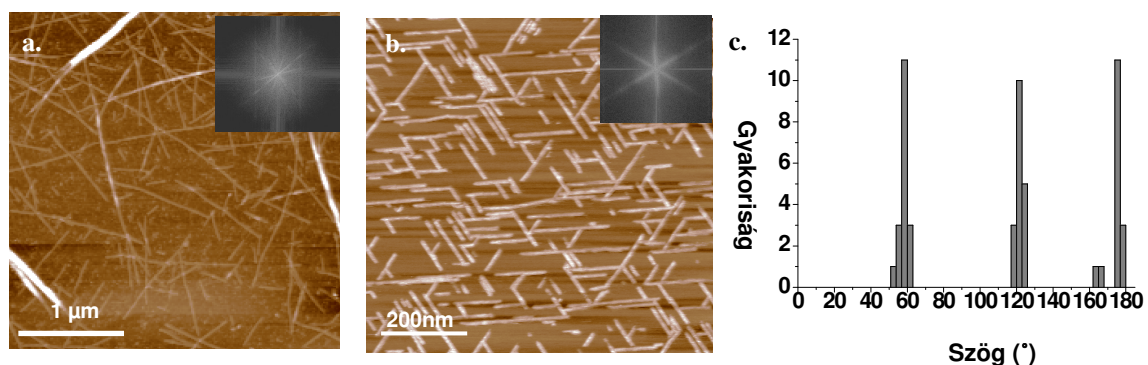
AB25-35 FIBRILLUMOK KÁLIUM FÜGGŐ ORIENTÁCIÓJA CSILLÁMFELSZÍNE

AB25-35 FIBRILLUMOK MORFOLÓGIÁJA CSILLÁMFELSZÍNE

AFM segítségével megvizsgáltuk csillámfelületre adszorbeált AB25-35 fibrillumok morfológiáját. A fibrillumok rájuk jellemző módon, nem véletlenszerűen mintázatot alakítanak (12.a ábra) ki, hanem szabályos trigonális elrendeződésben orientálódnak a felszínen (12.b ábra). Hasonló elrendezést figyeltek meg α -synuclein esetében csillámfelszínen.

A csillám felülete negatív, hidrofil, hexagonális kristályszerkezetű. Felszíni oxigén atomok mintegy 0,52 nm átmérőjű hatszögekbe rendeződve helyezkednek el, negatív töltésű és szintén hexagonális mintázatot mutató K^+ kötőhelyeket alakítva ki. Két szomszédos K^+ kötőhely távolsága szintén 0,52 nm. A csillám hasítása esetén ezek a kötőhelyek szabaddá válnak, mivel a K^+ ionok elektrosztatikus kölcsönhatással kapcsolódnak a kötőhelyekhez. A minta felcseppentésekor a gyengén kötött K^+ ionok képesek az oldatba diffundálni, kialakítva egy dinamikus egyensúlyt a szabad és telített kötőhelyek arányában. Ez az egyensúly elsősorban a minta illetve a puffer K^+ tartalmának függvénye.

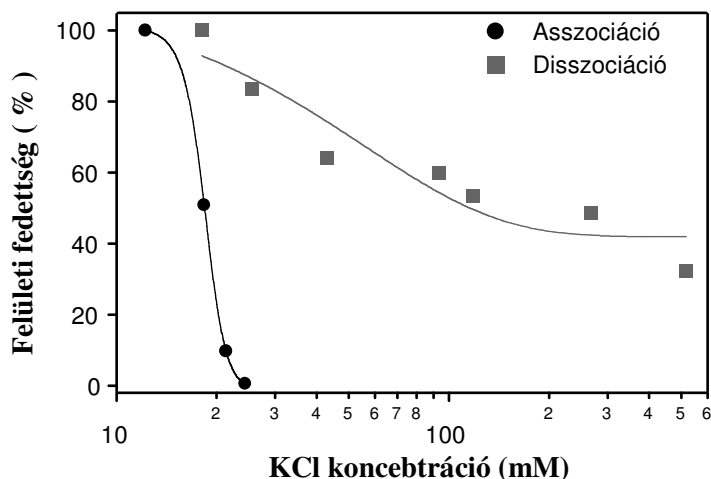
A csillám kristályszerkezete és a fibrillumok által kialakított hexagonális mintázat egyezése önmagában sugallja azt a lehetőséget, hogy a csillám rendezett kötőhelyei határozzák meg a fibrillumok elhelyezkedését.



12.Ábra. a. GOPS kezelt üvegfelületre kötött AB25-35 fibrillumok morfológiailag heterogének és véletlenszerű eloszlást mutatnak. (Pásztázó atomerő-mikroszkópos, oszcillációs üzemmódban, pufferben felvett magasságkontraszt felvétel) **Betétábra:** AFM kép 2D Fourier Transzformációja. **b.** Csillámfelületre adszorbeált AB25-35 fibrillumok jellegzetes trigonális elrendeződésben. **Betétábra:** AFM kép 2D Fourier Transzformációja. (Pásztázó atomerő-mikroszkópos, oszcillációs üzemmódban, pufferben felvett magasságkontraszt felvétel) **c.** Fibrillumok három fő irányának szögeloszlása, egy horizontális referencia vonalhoz képest.

AZ ORIENTÁLT KÖTŐDÉS KÁLIUM FÜGGÉSE

Az A β 25-35 fibrillumok orientált kötődése csillámfelszínhez erősen függ a médiumban lévő K⁺ koncentrációtól (13. ábra). K⁺ koncentráció növelésével gátolható az újabb fibrillumok letapadása. Ehhez a jelenséghez hasonlóan a már csillámfelszínhez kötődött fibrillumok megemelt K⁺ koncentráció hatására disszociálnak a felszínről. Ugyanakkor nagy eltérés mutatkozik a K⁺ érzékenység tekintetében a kötődést gátló koncentrációtartomány és a disszociációt előidéző koncentrációtartomány között.



13. Ábra. Az A β 25-35 kötődését már 12 mM K⁺ hozzáadása gátolja (szürke körök), míg 500 mM K⁺ hatására a lekötődött fibrillumok 60% disszociálódik (fekete négyzetek).

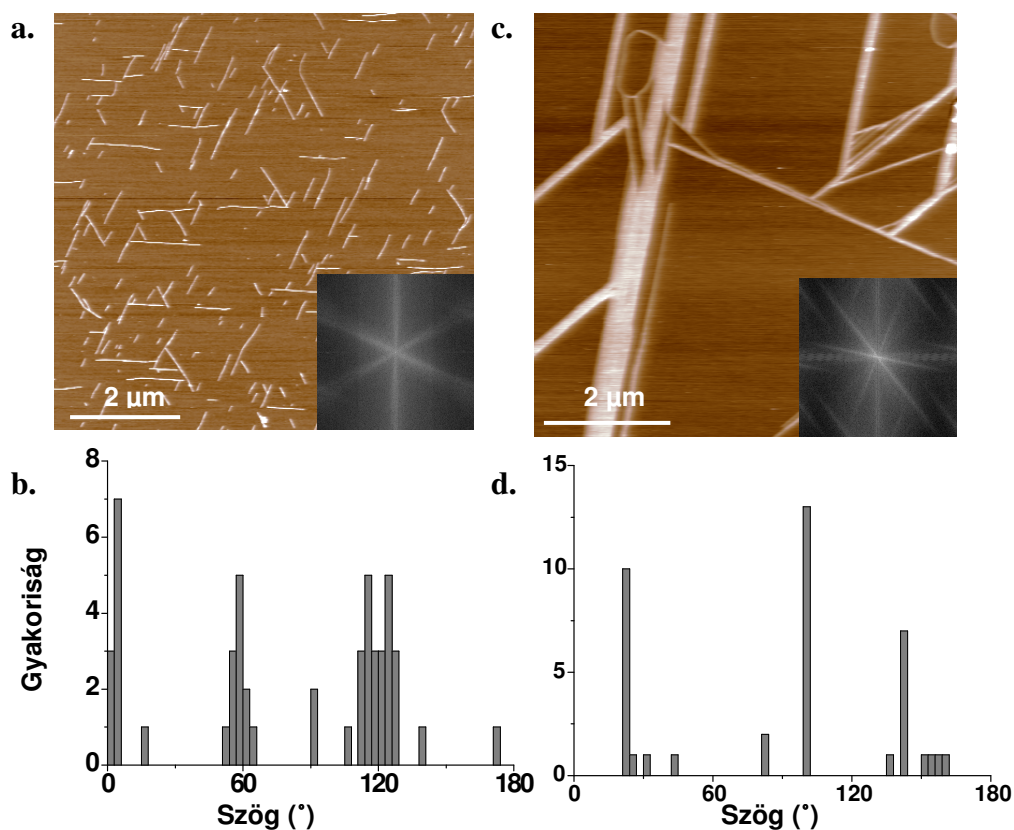
Ez a megfigyelés alátámasztja azt a hipotézist, hogy az A β 25-35 fibrillumok esetében elektrosztatikus kölcsönhatások határozzák meg a felszíni orientációt, melyek a fibrillumot felépítő egyes A β 25-35 peptidek valamely töltéssel rendelkező oldallánca és a csillám K⁺ kötőhelye között alakul ki.

AZ A β 25-35 ACETILÁLT VARIÁNSAINAK ORIENTÁCIÓJA CSILLÁMFELSZÍNEN

Az A β 25-35 peptid két olyan pozitív töltésű csoporttal rendelkezik, melyek képesek lehetnek interakcióba lépni a csillámfelszín K⁺ kötőhelyeivel. Az egyik az N-terminális aminos csoportja, a másik a Lys28 ϵ -aminocsoportja. Ezt a hipotézist olyan A β 25-35 variánsokkal kívántuk tesztelni, melyek esetében az említett aminos csoportokat a peptidszintézis során acetilálták.

Az A β 25-35_G25Ac fibrillumok a csillámfelületen a vadtypushoz hasonlóan, trigonális elrendeződésben orientálódnak, de a fibrillumok által bezárt szög sokkal nagyobb szórást mutat, (15.ábra) illetve megfigyelhetők olyan fibrillumok és fibrillum szakaszok, melyek jelentős mértékben eltérnek a fő orientációs iránytól.

Az A β 25-35_K28Ac fibrillumok viselkedése ezzel szemben nagymértékben eltér a vadtypustól. Bár az elrendeződés dominánsan trigonális, a fibrillumok által bezárt szög nem szabályos 60°, mint ez a szögeloszlási hisztogramon látható, valamint az A β 25-35_K28Ac fibrillumok képesek ellipszoid alakú struktúrákat létrehozni.

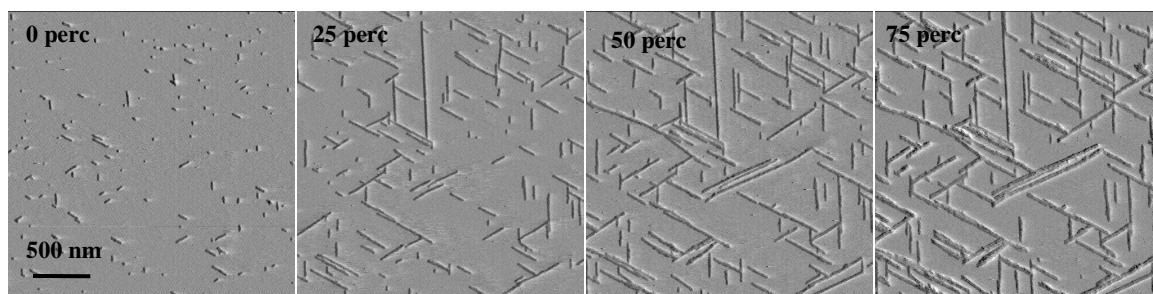


14. Ábra. **a.** A β 25-35_G25Ac fibrillumok csillámfelületén. **b.** Az A β 25-35_G25Ac fibrillumok szögeloszlási hisztogramja. **Betétábrák:** AFM kép 2D Fourier Transzformációja. (A képek magasságkontraszt felvételek, puffertben, oszcillációs üzemmódban készültek.) **c.** A β 25-35_K28Ac fibrillumok csillámfelületén. **d.** A β 25-35_K28Ac fibrillumok szögeloszlási hisztogramja.

Megállapítható, hogy az N-terminális aminocsoportja részt vesz a trigonális elrendeződés kialakításában, de szerepe feltehetőleg másodlagos, a Lys²⁸ ϵ -aminocsoportjához képest, mely eredményeink szerint elsősorban felelős a szabályos trigonális elrendeződés kialakításáért.

A β 25-35 FIBRILLUMOK NÖVEKEDÉSE CSILLÁMFELSZÍNEEN

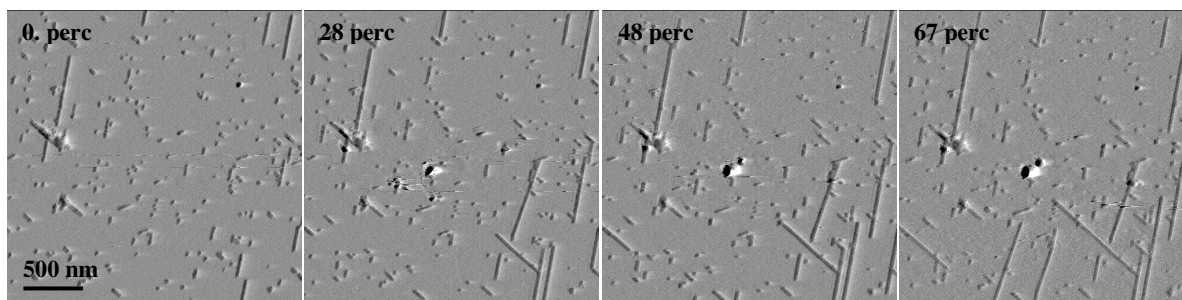
Csak A β 25-35 peptideket tartalmazó mintákon elvégzett időfüggő AFM mérésekből kiderült, hogy az A β 25-35 fibrillumok a csillámfelszínen alakulnak ki (15.ábra). A mérés kezdetén globuláris jellegű, tehát az alkalmazott rugólap tűátmérőjével összevethető méretű, partikulumok és rövid, 50-100 nm hosszú fibrillumok figyelhetők meg. Ezek alkotják a kezdeti növekedési magokat, melyekből kiindulva a felszínen nőnek ki az orientált fibrillumok. A hálózat növekedése során újabb kiindulási magok is keletkeznek, az oldatból a csillámfelszínre kötődő – feltehetően – A β 25-35 oligomerekből, melyekből újabb fibrillum növekedés indul. A növekedés egészen addig tart, 1.) amíg a növekvő fibrillum bele nem ütközik egy másik fibrillumba, illetve 2.) amíg szabad monomerek állnak rendelkezésre. Megfigyeltük, hogy a fibrillumok mindkét végükön növekednek, a növekedési sebesség pedig elérheti a 100 nm/perc értéket.



15. Ábra. Csillámfelszínen növekvő A β 25-35 fibrillumok amplitúdókontraszt AFM képei, melyek ugyanarról a területről készültek, folyamatos pásztázás mellett. Az egyes képek között eltelt idő a képek bal felső sarkában van jelölve.

Ha a kezdeti növekedési magok kialakulása után, a csillám pufferes lemosásával leállítjuk a folyamatot és lecseréljük a mintát 30 mM K⁺ iont is és A β 25-35 monomereket tartalmazó mintára, újabb növekedési magok nem alakulnak ki, mivel (mint ezt korábban kimutattuk) 30 mM K⁺ nagymértékben gátolja az A β 25-35 peptidek illetve oligomerek kötődését. Ugyanakkor a már kialakult fibrillumok a csillámfelszínről nem disszociálnak, mivel ehhez sokkal magasabb K⁺ koncentráció lenne szüksége (13.ábra).

Megfigyelhető (16.ábra), hogy, újabb növekedési magok nem alakulnak ki a felszínen, de a már kialakult magok illetve fibrillumok növekedése a megemelt K⁺ koncentráció ellenére tovább folytatódik.



16. Ábra. Csillámfelületen, 30 mM K^+ jelenlétében növekvő A β 25-35 fibrillumok. A képek készítése előtt a felület A β 25-35 magokkal lett bevonva 10 mM K^+ jelenlétében. Megjegyzendő, hogy 30 mM K^+ jelenlétében új magok leköötődése gátolt, ugyanakkor fibrillum növekedés megfigyelhető. Amplitúdókontraszt AFM képek ugyanarról a területről készültek, folyamatos pásztázás mellett. Az egyes képek között eltelt idő a képek bal felső sarkában van jelölve.

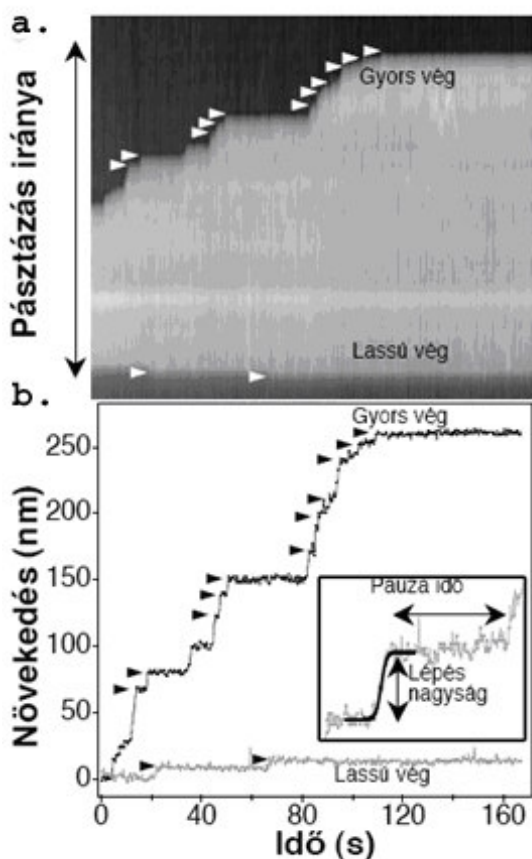
Tehát a csillámon történő fibrillum növekedés esetében két különböző interakciónak van kulcsfontosságú szerepe: 1.) a peptid kötődése a csillámfelület K^+ kötőhelyéhez. 2.) a peptid kötődése a fibrillumok szabad végéhez.

A β -FIBRILLUMOK VIZSGÁLATA PÁSZTÁZÓ PRÓBA KIMOGRÁFIÁVAL

A β 25-35 FIBRILLUMOK NAGYFELBONTÁSÚ NÖVEKEDÉSI DINAMIKÁJA

A pásztázó próba kimográfia egy, a laboratóriumunk által a világon elsőként alkalmazott, vizsgálati módszer, mellyel egyedi amyloid fibrillumok növekedési dinamikáját követtük nagy tér- és időfelbontással.

Az A β 25-35 fibrillumok pásztázó próba kimogramjai alapján következő megfigyeléseket tettünk: 1.) fibrillumok mindkét végükön nőnek, de az egyik végen (gyors vég) a növekedés jóval gyorsabb, mint a másikon (lassú vég). 2.) A fibrillumok nem csupán a csillámfelületen növekednek, hanem egy már meglevő fibrillum felületén is. Az ilyen fibrillum növekedési dinamikája hasonló a csillám felületén növekedőéhez. 3.) A fibrillumok nem folyamatosan, hanem a diszkontinuus, ugrásszerű növekedési mintát mutatnak. Hirtelen, gyors, lépésszerű növekedési periódusok váltakoznak növekedési szünetekkel vagy pauzákkal. (17.a ábra). A pauza az egymást követő lépések között eltelt idő. A nettó fibrillumnövekedés voltaképpen egymást követő ugrások és pauzák sorozata



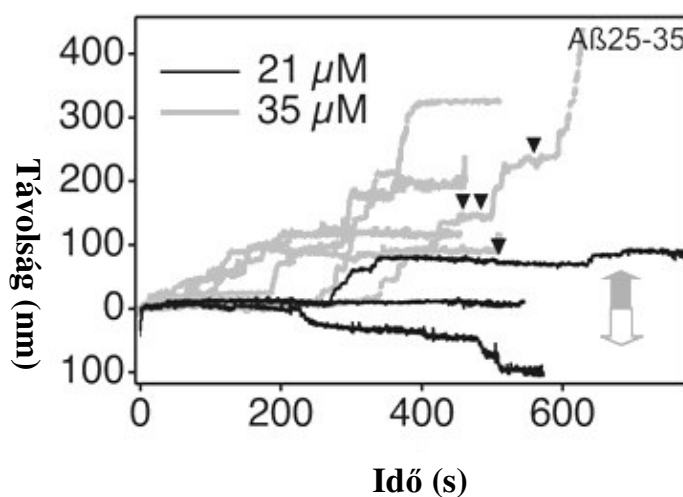
17. Ábra. a. Kimogram.

b. Kimogram időfüggő adatsorral alakítva. A fehér és fekete nyílhegyek az apró diszkrét növekedési átmeneteket mutatják.

Betét ábra: Szigmoid függvény illesztése egy lépcső alakú polimerizációs átmenetre.

Adaptált képanalízis algoritmusok segítségével a képi információt adatsorrá alakítottuk át. Becsléseink szerint a lassú végén az átlagos pauza egy nagyságrenddel nagyobb. A lépésmagyság hisztogram multimodális eloszlást mutat, melyben a csúcsok 8 nm-nél és ennek integrális többszöröseinél jelentkeznek mind a gyors, mind a lassú vég esetében.

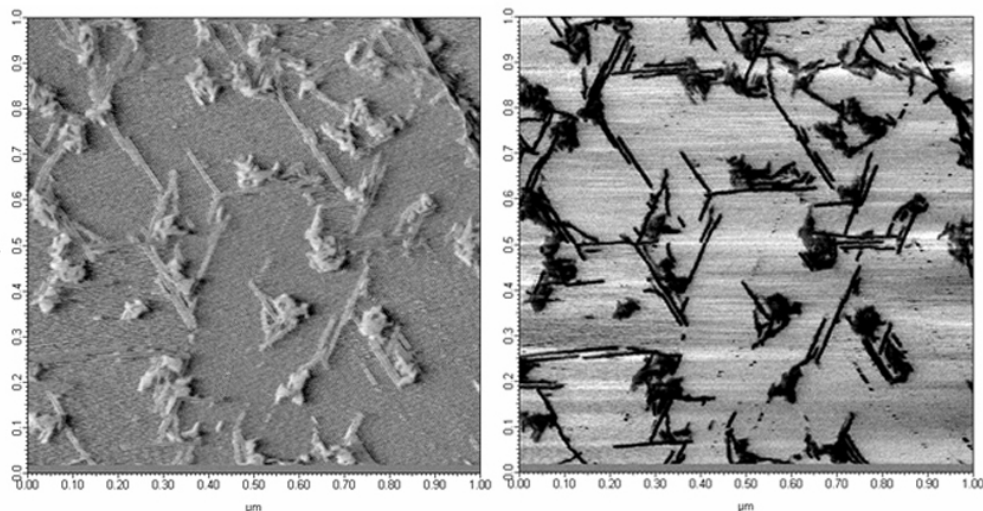
A kimogramok alapos elemzésekor feltűnt, hogy nem csak felépülési, hanem kis számban disszociációs lépések is megfigyelhetők (18.ábra). Ez a jelenség visszavezethető lehet a pásztázó rugólap tüje által okozott mechanikai hatásra. Ugyanakkor a disszociációs lépések mechanizmusa valószínűleg ennél összetettebb, mivel korrelációt mutat a peptid koncentrációval.



18. Ábra. Polimerizációs és disszociációs lépések különböző A β 25-35 peptid koncentráció mellett elvégzett kimográfias mérések esetében. A 35 μ M peptid koncentráció mellett a polimerizáció dominál, ugyanakkor disszociációs lépések is megfigyelhetők (nyilakkal jelzett pontok) 21 μ M mellett elvégzett méréseknél a disszociáció, illetve a fibrillum növekedésének stagnálása sokkal dominánsabban jelentkezik.

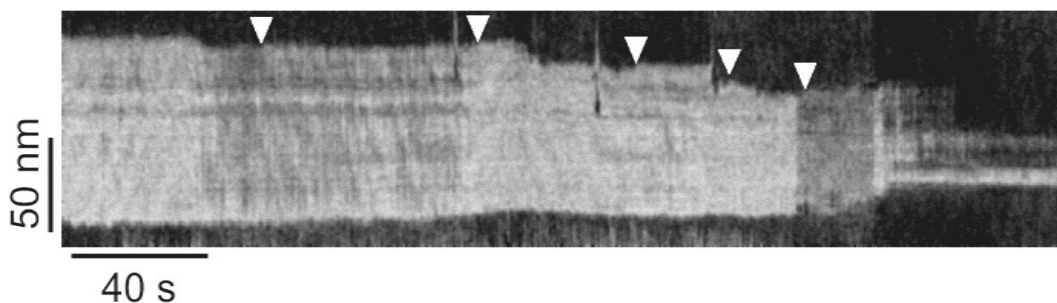
VI.5.2. A β 1-42 FIBRILLUMOK NÖVEKEDÉSI DINAMIKÁJÁNAK VIZSGÁLATA

Az A β 25-35 esetében csillámfelületen megfigyeltékhez hasonló, trigonális mintázatot alakít ki az A β 1-42 HOPG felületén (19.ábra).



19. Ábra. Trigonális elrendeződést mutató A β 1-42 fibrillumok amplitúdó (a.) és fázis kontraszt (b.) felvétele HOPG felületén. A fibrillumok jellegzetes szigetszerű eloszlást mutatnak. A szigeteket alkotó rövidebb fibrillumok a növekedés kezdeti fázisában alakulnak ki. Ezt követően épülnek fel a szigetekből kinyúló hosszabb fibrillumok.

Az A β 1-42 fibrillumokról rögzített kimogramok esetében (20.ábra) megfigyeltük, hogy a fibrillumokra a lépésekben történő disszociáció túlsúlya jellemző. Ugyanakkor a kimogramon rögzített dinamika ugyanazokat a karakterisztikus jegyeket hordozza magán, mint amiket a csillámfelületen növekvő A β 25-35 esetében megfigyeltünk. Megjegyzendő, hogy az apró növekedési lépések csak a fibrillum egyik végén láthatók.



20. Ábra. A β 1-42 fibrillum kimogramja, fázis kontraszt felvételen. A kimogramon látható, hogy a disszociációs lépések dominálnak, ugyanakkor rövid növekedési lépések is megfigyelhetők a nyilakkal jelzett pontokon.

I. ÖSSZEFOGLALÁS

1. Megfigyeléseink alapján karakterizáltuk az Alzheimer-kór pathogenezisében szerepet játszó A β 1-42 és A β 1-40 továbbá A β 25-35 valamint A β 25-35 Lys²⁸ ϵ -acetilált amyloid β -fibrillumok “mechanikai ujjlenyomatát”, mely az amyloid belső szerkezetére, rugalmasságára, kölcsönhatásaira, és a kölcsönhatások dinamikájára utal.

Megállapítottuk, hogy az A β -fibrillumokra univerzálisan jellemző elemi mechanikai jelenségek: az erő platók, melyek megjelenése protofilamentumok fibrillumról történő deszorpciójával magyarázhatók, illetve nemlineáris rugalmas erőválasz, mely a hidrogén híd rendszer terhelésével hozható összefüggésbe. Továbbá megfigyelhető ezen erőválaszok hierarchikus egymásra épülése. Az elemi erőválaszok, illetve azok kombinációi a vizsgált A β amyloid fibrillumok esetében spektrális mintázatukban nem, csupán az erőválaszok nagyságában térnek el egymástól.

Ezek a megfigyelések felvetik annak a lehetőségét, hogy az általunk alkalmazott módszer alkalmas lehet a különböző peptidekből növesztett amyloid fibrillumok szerkezeti dinamikájának és fizikai-kémiai paramétereinek feltérképezésére. Az A β 25-35 valamint A β 25-35 Lys²⁸ ϵ -acetilált amyloid β -fibrillumokkal végzett kísérleteink külön rámutatnak a módszer érzékenységére.

2. Megállapítottuk, hogy az A β 25-35 fibrillumok esetében elektrosztatikus kölcsönhatások határozzák meg a felszíni orientációt, jelezve egyúttal azt, hogy az A β 25-35 fibrillumok felszíni tulajdonságai kevésbé hidrofób jellegűek, mint más amyloid fibrillumoké.

Az A β 25-35 acetilált variánsainak vizsgálatával megállapítottuk, hogy a Lys²⁸ ϵ -aminocsoportja kulcsfontosságú az orientált kötődés kialakításában.

Karakterizáltuk az orientált A β 25-35 káliumfüggő kötődését és disszociációját, valamint kimutattuk, hogy a trigonális hálózat a csillámfelszínhez kötött, irányított növekedés útján jön létre.

A kialakuló rendezett mintázat és annak modulálhatósága (K^+ koncentráció, A β -peptid koncentráció változtatása) magában rejti a nanotechnológiai alkalmazhatóság lehetőségét.

3. Pásztázó próba kimográfiával alkalmazásával betekintést nyertünk az A β 25-35 fibrillumok növekedésének dinamikájába. Megállapítottuk, hogy a fibrillumok növekedése során hirtelen, gyors, lépésszerű növekedési periódusok váltakoznak növekedési pauzákkal. A nettó fibrillumnövekedés voltaképpen egymást követő ugrások és pauzák sorozata. Továbbá a fibrillum végek eltérő növekedési rátát mutatnak, mely alapján elkülöníthető egy gyorsan és egy lassan növvő vég.

Megfigyeléseink magyarázhatók egy olyan kétállapotú modellel, melyben az A β -fibrillum végei vagy növekvő, vagy blokkolt állapotban vannak. A blokkolt állapotban pauza lép fel, míg a növekvő állapotban gyors polimerizáció történik. A blokkolt állapotból a növekvőbe történő átmenet, és így a pauza időtartama, független a peptid koncentrációtól, jelezve, hogy a folyamatban peptidcsere nem megy végbe. Az átmenet során valószínűleg szerkezeti változás történik, mely elsőrendű kinetikát követ.

HOPG felszínen növekvő A β 1-42 fibrillumok esetében alkalmazott pásztázó próba kimográfiás vizsgálatokból megállapítottuk, hogy esetükben is hasonló növekedési dinamika figyelhető meg, mint amit csillámfelszínen az A β 25-35 fibrillumok esetében tapasztaltunk. Tehát itt is elkülöníthető volt az egyes végek eltérő növekedési, illetve disszociációs dinamikája, melyre lépésekben bekövetkező, időben pauzákkal elválasztott események voltak jellemzők. A kimográfiás mérések tanulsága szerint A β 1-42 fibrillumoknál a disszociációs lépések dominálnak, mely a gyengébb fibrillum-felszín interakcióra illetve intrafibrilláris szerkezetre vezethető vissza.

Feltételezzük, hogy a megfigyelt diszkontinuos, lépésszerű növekedési dinamika általánosan jellemző lehet a felszín által irányított növekedés mutató amyloid fibrillumokra.

PUBLIKÁCIÓS LISTA

A DOLGOZAT ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

1. Kellermayer, M.S.Z., Grama, L., Karsai, Á., Nagy, A., Kahn, A., Datki, Z. and Penke, B. Reversible unzipping of amyloid β -fibrils. *J. Biol. Chem.* **280(9)**, 8464-8470, 2005. IF 5,854 (2005)
2. Karsai, Á., Nagy, A., Kengyel, A., Mártonfalvi, Zs., Grama, L., Penke, B. and Kellermayer, M.S.Z. Effect of lysine-28 side chain acetylation on the nanomechanical behavior of Alzheimer amyloid β 25-35 fibrils. *J. Chem. Inf. Mod.* **45 (6)**, 1641-1646, 2005. IF 2.81 (2004)
3. Karsai, Á., Mártonfalvi, Zs., Nagy, A., Grama, L., Penke, B. and Kellermayer, M.S.Z. Mechanical manipulation of Alzheimer's amyloid β 1-42 fibrils. *J. Struct Biol.* **155**, 316-326, 2006. IF 3.49 (2005)
4. Árpád Karsai, László Grama, Ünige Murvai, Katalin Soós, Botond Penke and Miklós S Z Kellermayer
Potassium-dependent oriented growth of amyloid β 25–35 fibrils on mica
Nanotechnology 2007, 18. 345102 IF.:3,037 (2006)
5. Kellermayer MS, Karsai A, Benke M, Soós K, Penke B.
Stepwise dynamics of epitaxially growing single amyloid fibrils.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Jan 8;105(1):141-4. IF.: 9.643 (2006)

EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

1. Csutora P., Karsai Á., Nagy T., Vas B, Kovács L.G., Rideg O., and Miseta A. Lithium induces phosphoglucomutase activity in various tissues of rats and in bipolar patients
Int J Neuropsychopharmacol. 2005 Nov 1;1:1-7 IF: 3,981 (2005)
2. Kiss, B., Karsai, Á. and Kellermayer, M.S.Z. Nanomechanical properties of desmin intermediate filaments. *J. Struct Biol.* **155**, 327-339, 2006 IF 3.49 (2005)
3. Miklós S.Z. Kellermayer, Árpád Karsai, András Kengyel, Attila Nagy, Pasquale Bianco, Tamás Huber, Ágnes Kulcsár, Csaba Niedetzky, Roger Proksch and László Grama. Spatially and temporally synchronized atomic force and total internal reflection fluorescence microscopy for imaging and manipulating cells and biomolecules. *Biohys. J.* 91, 2665-2677, 2006. IF 4.757 (2006)

4. Karsai A, Murvai U, Soós K, Penke B, Kellermayer MS.
Oriented epitaxial growth of amyloid fibrils of the N27C mutant beta25-35 peptide.
Eur Biophys J. 2008 Jan 9 IF.:1,825 (2006)

REFERÁLT FOLYÓIRATBAN MEGJELENT ABSZTRAKTOK

1. Kellermayer, M.S.Z., Grama, L., Karsai, Á., Nagy, A., Kahn, A., Datki, Z. and Penke, B. Reversible unzipping of amyloid β -fibrils. *Biophys. J.* **88**, 198A-199A, 2005.
2. Kellermayer, M. S., Grama, L., Karsai, Á., Nagy, A., Kahn, A., Datki, Z., Penke, B. (2005) Structural dynamics of amyloid explored by manipulating individual fibrils *FEBS Journal* **272** (s1) F2-016P.
3. Miklós S.Z. Kellermayer, Árpád Karsai, Attila Nagy, András Kengyel, Tamás Huber, Zolt Mártonfalvi and László Grama. Synchronized atomic force and total internal reflection fluorescence microscopy for imaging cells and biomolecules. *Biophys J.* **90**, 2006.
4. Árpád Karsai, László Grama, Attila Nagy and Miklós Kellermayer. Oriented, potassium-dependent binding of amyloid beta25-35 fibrils to mica. *Biophys J.* **90**, 2006.
5. Miklós S.Z. Kellermayer, Árpád Karsai, Margit Benke, Katalin Soós, and Botond Penke. Stepwise assembly dynamics of single amyloid fibrils revealed by scanning force kymography. *Biophys. J.* **92**. 2007.
6. Árpád Karsai, Ünige Murvai, Katalin Soós, Botond Penke, and Miklós SZ Kellermayer. Oriented, Chemically Functionalized Amyloid Network With Controllable Mesh Size For Nanotechnology Applications *Biophys. J.* **94**: 2790. 2008