

Szegedi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

MAKROMOLEKULÁK SZERVEZŐDÉSE SZILÁRD FELÜLETEKEN

PhD értekezés tézisei

Nagy Krisztina

Témavezető: Dr. Váró György



Magyar Tudományos Akadémia
Szegedi Biológia Kutatóközpont
Biofizikai Intézet
Szeged, 2013

BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

Az önszerveződő folyamatok előfordulása a természetben és a nanotechnológiában is gyakori jelenségnek számít. Ezeknek a folyamatoknak nagyon nagy biológiai jelentősége van, hiszen a molekuláris önszerveződő folyamatok az élő sejtek működéséhez elengedhetetlenek. A lipidekből felépülő membránok, a DNS kettős spirál és a fehérjék negyedleges szerkezete csupán néhány példa, de ezek mindegyike van olyan fontos, hogy a tudományos érdeklődés középpontjában álljon.

A makromolekulák morfológiájának és szerkezetének tanulmányozásához speciális módszerekre van szükség. Ilyen például az atomerő mikroszkóp (*atomic force microscope = AFM*) is, mely 1986-ban jelent meg a pásztázó mikroszkópok családjának tagjaként. Az AFM egy nagyon kis rugóállandójú rugólapka végén elhelyezkedő néhány nanométer görbületi sugarú tűvel pásztázza végig a vizsgálandó objektum felszínét. A mérés során a van der Waals erők által befolyásolt felszíni egyenetlenségek okozta túelhajlást detektálják. A technika hamar elterjedt biológiai objektumok tanulmányozására, szubnanométeres felbontóképessége mellett a folyadékban történő mérések lehetősége kivételes előnynek számít.

Munkám célja makromolekulák szerveződésének tanulmányozása volt különböző felületeken. Tanulmányoztam a DNS építőelemeinek szerveződési tulajdonságait muszkovit csillám felületén, és kazein fehérjekomplexek felépülését töltéssel rendelkező felületen.

A dolgozat egyes részeiben a következő kérdésekre keresem a választ:

1. Az oligonukleotidok (ODN) 10-20 bázispárból álló makromolekulák, az örökítőanyagot hordozó DNS alkotóelemei. Funkciójuk betöltéséhez nagyon fontos, hogy specifikus önszerveződő tulajdonsággal

rendelkezzenek. Az önszerveződés eredményeként jellegzetes alakzatok jönnek létre. Az atomerő mikroszkóp közvetlen módszerként használható a jellemző struktúrák vizsgálatára. Célul tűztük ki annak megmutatását, hogy a különböző környezeti, fizikai-kémiai (oligonukleotid koncentráció, oldat pH-ja, felület minősége) paraméterek hogyan befolyásolják az oligonukleotidok önszerveződési tulajdonságait. Ezekből a vizsgálatokból egy általános következtetést remélünk levonni arra vonatkozóan, hogy a biológiailag fontos oligonukleotidok /makromolekulák sztereospecifikus reakcióinak katalizálásában milyen szerepük lehet a különféle felületeknek.

2. Felületek megfelelő módosításával befolyásolhatjuk, hogy milyenek legyenek arajtuk kialakuló struktúrák szerveződési feltételei. Azt már korábban megmutatták, hogy a váltakozóan pozitív/negatív töltésű polielektrolitokból felépített filmek képesek a fehérjét stabilizálni anélkül, hogy azok szerkezetét, biológiai aktivitását jelentősen befolyásolnák. Mi most a polielektrolit filmeknek ezt a képességét akartuk kihasználni arra, hogy nagyon alacsony koncentrációjú kazein oldatokból szinte egyenként adszorbeáltatva/rögzítve a fehérje molekulákat a filmek felszínén, lépésről-lépésre nyomon követhessük a kazeinek biológiai funkciójához, a kalcium-foszfát szállításához szükséges micellák kialakulását. Két vizsgálati módszer, az AFM és a Fourier transzformációs infravörös spektroszkópia segítségével nyomon tudjuk követni a lépésenként felépített kazein micellák makroszkopikus (nm-es skála) szerkezetének kialakulását, illetve a fehérjekomplexek másodlagos szerkezetét.
3. A kazeinek biológiai fontossága mind az emlősök életében, mind az emberiség táplálkozásában rendkívüli. Ezért nagyon fontos annak megértése, hogyan szerveződik az a szerkezet, aminek révén a kazeinek nagy mennyiségű kalcium-foszfátot tudnak az emlősök újszülöttjeinek

csontképződéséhez szállítani. Mivel az emberiség táplálkozásának jelentős része épül a különböző állatok tejére, illetve azok “biotechnológiailag” feldolgozott formáira, ezek az ismeretek gazdasági szempontból is nagyon fontosak. Az eddigi kutatások – a megfelelő technikák hiánya miatt mindig csak a kész, már kialakult micellák szerkezetét tudták vizsgálni – két, egymásnak ellentmondó modellhez vezettek. Célunk, hogy az eddigiektől alapvetően eltérő megközelítésünkkel, amikor a polielektrolit filmek tulajdonságainak változtatása révén széles tartományban változtathatjuk az önszerveződés feltételeit, olyan ismeretekhez jutunk a micellák felépülésének mechanizmusát illetően, melyekkel ezen modellek közti ellentmondások feloldhatóak.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Oligonukleotid-szintézis és mintakészítés

Az 5'-GAGCTGCACGCTGCCGTC-3' szekvenciájú, 18 bázisból álló oligonukleotid Expedite 8909 típusú szintetizátorral. A tisztítás Kromasil 100-CH8 250 x 10 mm ID oszlopon, nagynyomású folyadékkromatográffal történt, 0,1 M-os trietilammónium-acetát-acetonitril (pH=7.0) keveréket használva oldószerként. Az oligonukleotidokat Dr. Bottka Sándor csoportja (MTA Szegedi Biológiai Központ) készítette.

A minták előállításához 50 µl vizes oldatú ODN-t cseppentettem frissen tisztított, 15 x 15 mm²-es csillám (egyes méréseknél üveglap, szilícium, illetve grafit) felszínére, majd a mintát tisztított levegős fúvással 1 órán át szárítottam. Az ODN-oldatokat nagytisztaságú vízzel (Fluka) készítettem.

Polielektrolit filmek és kazein rétegek felépítése

A polielektrolit filmek készítéséhez a pozitív töltésű poli-allilamin-hidroklorid (PAH), illetve a negatív töltésű poli-sztirol-szulfonát (PSS) 1-1 mg/ml koncentrációjú oldatát használtam. A felület teljes fedettségének eléréséhez hat PAH/PSS kettős rétegre volt szükség.

Az AFM méréseknél a film hordozója frissen hasított, atomi simaságú negatív töltésű csillámlemez volt, amin a hat kettősréteg felépítését PAH réteggel kezdtem.

A teljes visszaverődéses Fourier-transzformációs infravörös (ATR-FTIR) méréseknél a polielektrolit film hordozója maga a teljes visszaverődéses fényvezetést biztosító ZnSe kristály volt, aminek felszínét – a megfelelő tapadás érdekében – elő kellett kezelni a pozitívan töltött poli-etilén-imin adszorpciójával (szintén 1 mg/ml oldatból). Ezután a hat kettősréteg felépítése a negatív PSS adszorpciójával kezdődött. A polielektrolit filmek felszínének töltését pozitívrá, illetve negatívra úgy állítottam be, hogy utolsó réteggént PAH-t, illetve PSS-t adszorbeáltattam.

Az α - és κ -kazeineket 10 mM HEPES pufferben 0.1 mg/ml koncentrációban oldottam fel, és ezekből az oldatokból adszorbeáltattam a polielektrolit filmek felszínére. Az alacsony koncentrációjú oldatból a kazeinek természetes aggregációs folyamata infravörös spektrométerrel követhető módon zajlik le, így magát a micella felépülésének folyamatát láthatjuk, nem csak a végeredményt, mint az eddig alkalmazott módszerek esetén.

A kalcium-foszfát nanoklaszterek kialakításához első lépésben 1 M-os CaCl_2 oldattal “árasztottuk el” az adszorbeálódott kazeint, a második lépésben 50 mM koncentrációjú Na_2HPO_4 oldattal egyrészt lemostuk a nem kötött Ca^{2+} ionokat, másrészt kialakítottuk a fehérjéhez kötött kalcium-foszfát klasztereket. Ezen klaszterek meglétét alapos pufferes mosás után FTIR méréssel ellenőriztük az $1200\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ tartományban megjelenő erős foszfát sávok alapján.

Atomerő mikroszkópia

A méréseket Asylum MFP-3D típusú AFM-mel végeztem. A képkészítést AC (tapping) módban végeztem, a rugólapkát sajátfrekvenciájához közeli értéken rezgetve. A képek 512x512 képpontos felbontással készültek. Az oligonukleotidok tanulmányozásához száraz mintákat használtam és a mérés levegőben történt, a kazein fehérjével kapcsolatos kísérleteket pedig folyadékban végeztem. A pásztázás során a rugólapka mindkét irányba történő mozgását külön regisztráltam, majd a kapott képeket összehasonlítva szűrtem ki az esetleges műhibákat és beállítási problémákat.

Az oligonukleotidok szerveződésekor megjelenő struktúrák leképezéséhez alumíniummal bevont, szilíciumból készült AC240TS-C2 típusú tűket használtam. A tűk rezgési frekvenciája 70 kHz, rugóállandójuk 2 N/m és görbületi sugaruk 10 nm-nél kisebb.

A polielektrolit filmekben és kazein fehérjén folyadékban végzett topográfiai és erőmérések arannyal bevont, szilícium-nitridből készült Bio-Lever A (BL-RC150 VB-C1) típusú tűkkel készültek. A rugólapkák nominális rugóállandója 30 pN/nm, saját rezgési frekvenciája 37 kHz levegőben.

Az AFM segítségével a topográfia mellett a felszín rugalmasságáról is kaphatunk adatokat. Az erőmérések a képkészítés során is használt tűkkel történtek. A Young modulus kiszámításához az erőgörbék felszín felé tartó ágát használtam. A kemény csillám felszínen referenciagörbékét készítettem, melyeket kivonva a fehérjerétegen mért erőgörbékből az úgynevezett benyomódási görbékhez jutottam. A benyomódás mértéke információt nyújt az anyag keménységére vonatkozóan. Erőméréseket végeztem a fehérje minden állapotában (minden kezelés után), és a kapott erő-benyomódás görbékét összehasonlítottam.

Infravörös spektroszkópia

A planáris kazeinréteg szerkezetének vizsgálatára az AFM mellett infravörös spektroszkópiát használtam teljes visszaverődéses üzemmódban (ATR-FTIR). A méréseket Bruker Vertex 70 típusú Fourier-transzformációs infravörös spektrométerrel és Bruker Opus szoftverrel végeztük. Belső reflexiós elemként egy ZnSe kristályt használtam, ez biztosította a szilárd hordozófelületet a polielektrolit/fehérje film felépítéséhez is. A spektrumokat szobahőmérsékleten, D₂O alapú pufferben vettem fel.

Minden egyes réteg adszorpciója, vagy bármilyen, a már meglévő mintát befolyásoló beavatkozás (pl. kalcium-foszfát nanoklaszterek kialakítása) után infravörös intenzitás spektrumot vettem fel. Ezekből azután a megválaszolandó kérdés kívánalmainak megfelelően tetszés szerint számolhattam infravörös abszorpciós spektrumokat, a beavatkozás előtt felvett intenzitás spektrumot tekintve a háttérnek, a beavatkozás utánit pedig a mintának. Ily módon ki lehetett mutatni az adott lépésben adszrobeáltatott polielektrolit/fehérje réteg meglétét/szerkezetét. A fehérjék jellemzésére elsősorban az 1700-1600 cm⁻¹ tartományban levő Amide I' tartományt használtam fel.

EREDMÉNYEK

1. Oligonukleotidok adszorpciója és szerveződése

A 18 bázispárú oligonukleotidok (ODN) vizes oldatát leszárítottam, majd atomerő mikroszkópos képeket készítettem. Az ODN-ek önszerveződésének tanulmányozásakor három paraméter hatását vizsgáltam: a felvitt anyag koncentrációját, a kiindulási oldat kémhatását és a felület anyagi minőségét.

Több különböző ODN-koncentrációjú oldatot készítettem a frissen tisztított muszkovit csillám felszínére. Azt tapasztaltam, hogy a kiindulási oldat koncentrációjának függvényében különböző struktúrák alakulnak ki. 20 nM-os koncentrációt használva 1 μm hosszú, átlagosan 1.1 ± 0.3 nm magas, az *in vivo* körülményekre emlékeztető szálak alakzatok jelennek meg a felszínen. A koncentráció növelésével a kialakuló struktúrák egyre bonyolultabbá válnak, a szálak egymáson átfednek és hálózatokat alkotnak.

A 20 nM ODN-koncentrációjú oldatot leszárítva azt tapasztaltam, hogy a szálak szerkezetek csak akkor alakulnak ki, ha a kiindulási oldat pH-ja egy jól meghatározott, szűk, savas tartományon ($\text{pH} = 3.4 - 4.0$) belül van. Más esetekben apró csomók formájában figyelhetjük meg az aggregálódó ODN-t a csillám felszínén.

A harmadik vizsgált paraméter a felület anyagi minősége, ezzel próbálván feltárni a felszín kémiai összetételének szerepét a struktúrák kialakulásában. Négy különböző felületre szárítottam oligonukleotidokat. A méréseket a szálak struktúrák kialakulása szempontjából optimálisnak tekinthető 20 nM-os koncentrációjú ODN-oldattal végeztem $\text{pH} = 4.0$ -n. Az alkalmazott felületek (az eddig használt muszkovit csillámon kívül) a következők voltak: üveg, szilícium (100) és magas rendezettségű pirolitikus grafit (HOPG). A szilícium felszínén a szálak alakzatok helyett apró (2-3 nm magas) csomókként jelentek meg az ODN molekulák. A HOPG felületén az oligonukleotidok tanulmányozása

sikertelennek bizonyult, csupán a grafit lamelláris szerkezetét tudtuk leképezni az AFM segítségével. A leszártott makromolekulák feltehetőleg az egyes rétegek találkozási pontjaiban helyezkedtek el. Az üvegfelületen, annak néhány nanométeres felszíni érdekessége miatt, az AFM-mel technikailag lehetetlennek bizonyult az oligonukleotidok megfigyelése. A csillám felületén feltehetőleg a felszíni töltések segítik elő a jellegzetes struktúrák megjelenését. Feltehetőleg a szárítási procedúra alatt kialakult gyengén lokalizált pozitív töltések (a K^+ -ionokhoz köthetők) adják, a részlegesen negatív oligonukleotidok számára, a kikötődés lehetőségét a megfigyelt szálak formájában.

2. Polielektrolit filmek és fehérjék kölcsönhatása

Dolgozatom második felében töltéssel rendelkező polielektrolitokból felépített többrétegű filmek felületére adszorbeált kazein fehérjék aggregálódását, viselkedését mutatom be. Első lépésben egy kazein monoréteget hoztam létre szilárd hordozófelületen, majd azt vizsgáltam milyen körülmények között alkalmas ez a réteg kalcium- és foszfátionok megkötésére, ill. további fehérjékkel való kölcsönhatásra. Az ATR-FTIR mérések során készített abszorpciós spektrumokon az Amid I' sávok mutatják a fehérje jelenlétét, mennyiségét és szerkezetét, a megjelenő foszfátsúcsok pedig igazolják, hogy a fehérje „működőképes”, azaz képes az adott ionok megkötésére.

A fehérje kezelésének minden lépésekor (a fehérje nélküli „csupasz” polielektrolit filmen, a kazein réteg filmre történő ráhelyezése után, a fehérjefelület $CaCl_2$ -oldatba helyezése után, a Na_2HPO_4 -os kezelés után, majd az újabb fehérjével történő kölcsönhatás után is) AFM képeket készítettem a réteg felszínéről, és az erő-benyomódás görbéket is mértem. A felszínen jellegzetes, kb. 20 nm-es csomók láthatók.

Az erőmérések alapján egyértelműen megállapítható, hogy a fehérje szerkezetében a kalciumionok hatására szerkezetváltozás következik be, ami a felszín keményedésével jár. A foszfátos kezelés már nem változtatja tovább a

kalciumionok kötésekor létrejött kompakt szerkezeti struktúrát. A felszín egy újabb fehérjeréteg adszorbeálásával visszanyeri eredeti rugalmasságát.

A pozitívan töltött polielektrolit rétegre adszorbeált kazeinréteg elvesztette képességét mind a kalcium-foszfát nanoklaszterekkel, mind a többi kazein molekulával való kölcsönhatásra. Pozitív töltésű felszínre való adszorpció esetén a kazeinekre nagyon jellemző foszfoszeril oldalláncoknak mindenképpen részt kell venniük a polielektrolit filmmel való kölcsönhatásban. Ezzel bizonyítottam, hogy ezek a negatívan töltött csoportok részt vesznek a kalcium-foszfát nanoklaszterek kialakításában, illetve, hogy a kalcium-foszfát nanoklaszterek hiányában nem folytatódik a micella felépülése.

Abban az esetben, ha a fehérje alatt közvetlenül polianionos réteg helyezkedik el az adszorbeálódott kazeinréteg megőrzi kalcium- és foszfátkötő képességét. A CaCl_2 , illetve a Na_2HPO_4 kezelés sorrendjének felcserélésével bebizonyítottam, hogy (összhangban a fenti AFM eredményekkel) a fehérjének előbb kalcium ionokat kell megkötnie, és csak azután válik szerkezete alkalmassá a foszfátionok kötésére is, ebben az állapotában pedig új kazein fehérjével találkozva aggregálódásra hajlamos.

3. Kazein rétegek egymásra épülése

A fenti kísérleti elrendezést használva modelleztem a kazein micellák felépülését és a kalcium-foszfát szerepét a folyamatban.

Megállapítottam, hogy a kalcium- és foszfátionok kötése után a kazein alkalmassá válik újabb fehérjével történő kölcsönhatás kialakítására. Ez a megállapítás az általam használt α_s - és κ -kazeinre egyaránt érvényesnek bizonyult. Ezek a kalcium-foszfát klaszterek által összetartott fehérje-aggregátumok nagyon hasonlóak lehetnek az *in vivo* előforduló micellaképződés során kialakuló struktúrákhoz.

Annak ellenőrzésére, hogy az aggregátumok növekedése megállítható-e a természetben is valószínűsíthetően előforduló módon, ellenőriztem képes-e

valamelyik kazein előzetes kalcium- és foszfátkezelés nélkül is kölcsönhatást kialakítani a felső fehérje réteggel. Megállapítottam, hogy a felszíni kalcium-foszfát klaszterek jelenléte nélkül csupán a κ -kazein képes adszorbeálódni az α -kazein felületére, és ez a kölcsönhatás β szerkezeti elemek megjelenéséhez vezet. Ez a κ -kazein réteg már nem képes más fehérjével kölcsönhatásba lépni.

Kísérleteim alapján a kazeinek *in vivo* micellaképződésére vonatkozóan a következő eredményre jutottunk: A micellák kb. 20 nm-es kazein aggregátumokból épülnek fel, melyeket hidrofób kölcsönhatások tartanak össze. A fehérjék negatív foszfoszerril csoportjai biztosítják a kalcium-foszfát nanoklaszterek számára a kötődést, amihez aztán újabb fehérjék képesek aggregálódni, most már pozitív oldalláncok segítségével. Ez az aggregálódás mindaddig fenntartható, amíg kalcium-foszfát van jelen. Kalcium-foszfát hiányában csak a κ -kazein képes kötődni a korábban adszorbeáltatott kazein molekulákhoz, és a mérések szerint sokkal "lágyabb" lévén, az α -kazeinnel való kölcsönhatásában olyan β -szerkezetek indukálódnak, amik az α -kazeinben nem, és amelyek képesek lehetnek "befedni" a micella tovább épüléséhez szükséges csoportokat, kalcium-foszfát kötőhelyeket. Ezért a kalcium-foszfát nélküli κ -kazein adszorpció végét vetheti a kazein micella épülésének.

ÖSSZEFOGLALÁS

Atomerő mikroszkóppal sikerült megfigyelnem csillámfelületen a 18 bázisú oligonukleotidok jellegzetes önszerveződési struktúráit, amelyek szerkezetét különböző fizikai/kémiai paraméterek befolyásolják. Meghatároztam azokat a kezdeti körülményeket (20 nM, pH = 4), melyek optimálisak a szálak alakzatok megjelenéséhez csillám felszínén. Kimutattam, hogy a felület minőségének meghatározó szerepe van a struktúrák kialakulásában. (*Journal of Physical Chemistry C*, publikációs lista I.).

Szilárd felületen létrehozott polielektrolit film és kazein fehérjék kölcsönhatását vizsgáltam. Kísérleteim hozzájárulnak a kazein micellák felépülésének megértéséhez. Vizsgáltam a kalcium- és foszfátionok szerepét a folyamatban. Az AFM-es mérésekből származó információkat ATR-FTIR mérésekkel is alátámasztottam, kiegészítettem. Megállapítottam, hogy kalcium-foszfát jelenlétében a fehérjék aggregálódásra hajlamosak, belőlük multirétegek állíthatók elő. A folyamat lezárására a kalcium-foszfát jelenléte nélkül is kötődő κ -kazein képes. (*Journal of Biological Chemistry* és a *European Biophysics Journal*, publikációs lista II-III.).

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Doktori értekezésem a MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biofizikai Intézetében végzett munkám és tanulmányaim eredményeként készült. Munkám sikeréhez nagymértékben hozzájárult az a rengeteg támogatás melyet munkatársaimtól, barátaimtól kaptam.

Mindenekelőtt témavezetőmnek, Dr. Váró Györgynek fejezem ki mély tiszteletem és köszönetem. Attól a pillanattól kezdve, hogy harmadéves egyetemi hallgatóként csatlakoztam csoportja tudományos munkájához, nagy odafigyeléssel segítette, irányította szakmai tanulmányaimat és munkámat. Szakmai tudása és jelleme követendő példa számomra.

Köszönöm közvetlen munkatársaimnak, Dr. Bálint Zoltánnak, Dr. Szegletes Zsoltnak és Végh Attila Gergelynek a sok értékes szakmai tanácsot, amit munkám során kaptam. A mérések kivitelezésénél, az adatok kiértékelésénél tapasztalataikkal segítségemre voltak.

Hálás vagyok Dr. Szalontai Balázsnak és munkatársainak, hogy részt vehettem a polielektrolitokkal és a kazein fehérjével kapcsolatos kutatásokban, a kísérletekhez szükséges anyagokat a rendelkezésemre bocsátották és a témában szerzett tapasztalataikkal segítették munkámat.

Köszönöm Dr. Ormos Pálnak, a Biofizikai Intézet igazgatójának, a Szegedi Biológiai Kutatóintézet főigazgatójának a lehetőséget, hogy az AFM csoporthoz csatlakozva az intézet munkatársaként végezhettem PhD tanulmányaimat. A Biofizikai Intézet összes dolgozójának köszönöm az ösztönző, kreatív légkör megteremtését és a mindennapos hasznos beszélgetéseket.

Külön köszönöm családomnak a szeretet és bátorítást, valamint minden barátomnak, aki mellettem állt és támogatott ezekben az években.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

- I. Z. Bálint, **K. Nagy**, I. Laczkó, S. Bottka, G. A. Végh, Zs. Szegletes, Gy. Váró (2007): Adsorption and Self-Assembly of Oligodeoxynucleotides onto a Mica Surface, *Journal of Physical Chemistry C*, 111. 17032–17037.
- II. **K. Nagy**, A. Pilbat, G. Groma, B. Szalontai, F.J.G. Cuisinier (2010): Casein Aggregates Built Step-by-Step on Charged Polyelectrolyte Film Surfaces are Calcium Phosphate-cemented, *Journal of Biological Chemistry*, 285. 38811-38817.
- III. **K. Nagy**, Gy. Váró, B. Szalontai (2012): K-casein terminates casein micelle build-up by its ‘soft’ secondary structure, *European Biophysics Journal*, 41. 959-968.

EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

- IV. I. Husu, L. Rinyu, **K. Nagy**, K. Szebenyi, T. Kortvelyesi, M. Giustini, L. Nagy, (2006): Relations between structure and biological affectivity for Q(B) site inhibitors of bacterial photosynthetic reaction centers, *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* 275–276 Suppl. S.
- V. L. Nagy, K. Hajdu, B. Fisher, K. Hernádi, **K. Nagy**, J. Vincze (2010): Photosynthetic Reaction Centres – from Basic Research to Application Possibilities, *Notulae Scientia Biologicae* 2 (2) 2010, 7-13.
- VI. A. G. Végh, Cs. Fazakas, **K. Nagy**, I. Wilhelm, I.A. Krizbai, P. Nagyörszi, Zs. Szegletes, Gy. Váró (2011): Spatial and Temporal Dependence of the Cerebral Endothelial Cells Elasticity, *Journal of Molecular Recognition*, 24. 422-428

- VII. L. Giotta, D. Matrogiacomio, A. Agostiano, F. Italiano., F., Milano, **K. Nagy**, M. Trotta, L. Valli (2011): Reversible binding of Ni²⁺ ions onto bacterial layers revealed by protonation-induced ATR-FTIR difference spectroscopy, *Langmuir*, 27. 3762-3773.
- VIII. K. Hajdu, T. Szabó, M. Magyar, G. Bencsik, Z. Németh, **K. Nagy**, A. Magrez, L. Forró, Gy. Váró, K. Hernádi, L. Nagy (2011): Photosynthetic reaction center protein in nano structures, *Physica Status Solidi B.*, 248 (11) 2700-2703.
- IX. A. G. Végh, **K. Nagy**, Z. Bálint, Á. Kerényi, G. Rákhely, Gy. Váró, Zs. Szegletes (2011): Effect of antimicrobial peptide-amide, indolicidin on biological membranes, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011. 670589.
- X. A. G. Vegh, C. Fazakas, **K. Nagy**, I. Wilhelm, J. Molnar, I. A. Krizbai, Z. Szegletes, G. Varo (2012): Adhesion and stress relaxation forces between melanoma and cerebral endothelial cells, *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*, 41. 139-145.
- XI. A. Marton, Cs. Vizler, E. Kusz, V. Temesfoi, Zs. Szathmary, **K. Nagy**, Zs. Szegletes, Gy. Varo, L. Siklos, R. Katona, V. Tubak, O.M. Zack Howard, E. Duda, J. Minarovits, K. Buzas (2012): Melanoma cell-derived exosomes alter macrophage and dendritic cell functions *in vitro*, *Immunology Letters*, 148. 34-38.
- XII. T. Szabó, G. Kozák, G. Bencsik, Cs. Visy, Z. Gingl, **K. Nagy**, Gy. Váró and L. Nagy (2013): Interaction between photosynthetic reaction centers and ITO, *Materials Science and Engineering C*, 33. 769-773.