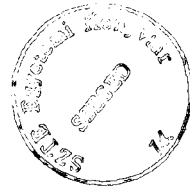


**PHD ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

# **A *BACILLUS SUBTILIS* ÁLTALÁNOS STRESSZVÁLASZA**



**Készült: SzETE (JATE) Biotechnológiai Tanszék**

**Témavezetők:**

**Dr. Kovács Kornél**

**Dr. Mécs Imre**

**Készítette:**

**Kovács Tamás**

**2000**

## I. BEVEZETÉS, ELŐZMÉNYEK

Az *Escherichia coli*, ha egy adott tápanyag a médiumban az optimális koncentráció alá esik, olyan válaszreakciót ad, melynek vannak az adott tápanyagra nézve specifikus elemei (pl. cAMP/CRP – C-limitációnál, NtrB/NtrC/ $\sigma^{54}$  – N-limitációnál, PhoR/PhoB – P-limitációnál) (Nixon et al., 1986, von Kruger et al, 1999, Van Dien and Keasling, 1998). Ezekben az esetekben a baktérium folytatja növekedését. Amennyiben azonban a baktérium környezete teljesen kimerül az adott tápanyagban, a baktérium stacionáris fázisba lép, és ekkor a kiváltó hiányzó tápanyag minőségétől teljesen független, általános stresszválasz következik be. Ezt a fajta stresszválaszt többféle, erős stresszhatás is ki tudja váltani. Ugyanez a megállapítás igaz a *Bacillus subtilis* –re is, mely Gram + baktérium és az edaphon részeként a talaj felsőbb rétegeiben él.

Természetes közegében rendkívül sokfajta stresszhatásnak van kitéve. Egy viszonylag gyenge és rövid ideig tartó stresszre adott válasz lehet a hatás által irányított, vagy csupán kiváltott mozgás, és/vagy különböző stresszfehérjék szintézise. Ez utóbbiak egy része chaperone, mások a sejt anyagcseréjének átállítására szolgálnak, vannak köztük lebontó enzimek, membránfehérjék, és például a károsodott DNS javítására szolgáló enzimek is.

A stresszhatások eredményeképpen a baktérium stacionáris fázisba léphet. Ekkor a sejtosztódás szünetel, de a sejt vegetatív marad. Ha a *B. subtilis* képtelen az adott körülmények között tovább vegetatív sejtként élni, akkor –a genetikai állomány megőrzése érdekében- bekövetkezik a sporuláció.

Ahhoz, hogy a *B. subtilis* alkalmazkodni tudjon a megváltozott körülményekhez (és a fent említett élettani folyamatok végbemehessenek) szükséges gén-expressziós mintázatának megváltoztatása. A gén-expresszió szabályozásának a baktériumok esetében igen elterjedt módja az alternatív  $\sigma$  faktorok használata. A  $\sigma$  faktor az RNS-polimeráz enzim egyik alegysége, mely szükséges a gének promoter-szekvenciájának felismeréséhez. Különböző szerkezetű  $\sigma$  faktorok általában különböző promoter-szekvenciákat ismernek fel. A housekeeping gének promotereit a housekeeping  $\sigma$  faktor (*B. subtilis*-ben a  $\sigma^A$ ) ismeri fel. Az ettől eltérő promoter-specifitású  $\sigma$  faktorokat alternatív  $\sigma$  faktoroknak nevezzük. *B.*

*subtilis*-ben eddig 16 alternatív  $\sigma$  faktort írtak le. A *B. subtilis* legrégebben leírt alternatív szigma-faktora a  $\sigma^B$  volt (Haldenwang and Losick, 1980).

Jelen munka kezdetekor ismert volt, hogy a  $\sigma^B$ -regulon génjei az alábbi stresszhatások esetén indukálódnak: hő sokk, sóstressz, oxigén-limitáció, glükóz-limitáció, oxidatív stressz (Völker et al., 1994), szétkapcsolószér (karbonil cianid m-klórfenilhidrazon: CCCP) hatása, az  $F_1F_0$ ATP-áz gátlószérének (N,N'-diciklohexilkarbodiimid (DCCD)) hatása (Alper et al., 1994). Ezen indukciós hatások alapján valószínűsíthető volt, hogy a  $\sigma^B$  regulon olyan stresszfehérjéket foglal magába, melyek a különböző stresszhatások elleni toleranciában játszhatalnak szerepet.

Annak ellenére, hogy a fenti stresszhatások alatt a  $\sigma^B$  regulon indukálódott, hiánya semmilyen változást nem okozott a vegetatív sejtek növekedésében, stressztoleranciájában és sporulációjában (Binnie et al., 1986, Duncan et al., 1987, Hecker et al., 1989, Boylan et al., 1993).

Fontos kérdés, hogy milyen sejten belüli jel-átalakítási mechanizmus révén indukálják a környezeti stresszhatások a  $\sigma^B$  regulont. Sokáig tartotta magát az a hipotézis, mely szerint a sejt ATP-koncentrációjának csökkenése közvetlenül okozza a  $\sigma^B$ -regulon indukcióját. Később bizonyítást nyert, hogy az intracelluláris ATP-koncentráció csökkenése és a  $\sigma^B$  indukciójának mértéke között nem áll fenn lineáris összefüggés (Maul et al., 1995). A közvetlen indukciós szignál mibenléte azonban nyitott kérdés maradt.

Az alternatív  $\sigma$  faktorokon kívül a baktériumokban a génexpresszió fontos szabályozó elemei a kétkomponensű rendszerek. Közös jellemzőjük egy jel-érzékelő hisztidin-kináz és az ezáltal szabályozott szabályozó fehérje, amely speciális gén expressziós mintázatbeli változást okoz (Hoch and Silhavy, 1995). A kétkomponensű rendszerek a legnagyobb ismert bakteriális szabályozó fehérjék családját alkotják. Legáltalánosabb formája a kétkomponensű rendszereknek, hogy a jelérzékelést, a jel-átvitelt és a transzkripciót befolyásoló szabályozó funkciót két fehérje hordozza (Msadek et al., 1999). Azt a korábbi dogmát, hogy a szabályozó fehérje foszforilált alakja lehet csak aktív, megdöntötte a DegS/DegU rendszer, ugyanis a DegU és a DegU~P is aktív, bár más-más élettani hatást fejtenek ki. A felhalmozott DegU~P élettani hatásai a következők: glükóz jelenlétében sporulációra való képesség, a genetikai kompetencia gyenge kifejlődése, filamentózus sejt-morfológia, flagella- és motilitás-vesztés, nagy mennyiségben szekretált extracelluláris degradatív enzim. A DegU~P az *srf* gátlásán keresztül gátolja a kompetencia kifejeződését. A DegU~P a

*sigD* (a  $\sigma^D$  struktúrgénje, szükséges a motilitás kifejlődéséhez) erős negatív szabályozója. A DegU~P általi gátlás biztosíthatja, hogy a jelentős mennyiségű extracelluláris enzimet szekretált sejt helyben „várja meg” enzimeinek „gyümölcsét”: a felvehető tápanyagot.

A defoszfonilált DegU a késői kompetencia gének expressziójához szükséges. A defoszfonilált DegU nem befolyásolja a motilitást.

A DegS/DegU rendszer NaCl stressz esetén bizonyítottan befolyásolja némely gén sóstressz alatti expresszióját, így például NaCl stressz esetén a sejtfal-asszociált fehérjét kódoló *wapA* gén expresszióját a DegS/DegU rendszer negatívan befolyásolja. Mivel a *B. subtilis* egy fontos sejtfal-asszociált fehérjéjének (*WapA*) koncentrációját a DegS/DegU rendszer befolyásolja, nem volt kizárható, hogy a baktériumok sejtfelszíni töltés-megoszlási viszonyaira, ezen keresztül pedig kitapadási képességére is befolyással legyen. Ez a felvetés amiatt is megalapozottnak tűnt, mivel néhány vizsgálat nyomán bizonyítást nyert, hogy némely baktérium species esetében különböző stresszhatásokra megváltozik a sejtek hidrofilitása, tehát egy olyan több tényező befolyása alatt álló tulajdonsága, mely alapvetően meghatározza a sejtek kitapadási jellemzőit.

## II. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során az alábbi kérdésekre kívántunk választ találni:

1. Mi az a sejten belüli jel, ami mindenképpen előfeltétele a  $\sigma^B$  regulon aktiválásának?
2. Mi a  $\sigma^B$  élettani jelentősége (van-e olyan stressz-körülmény, amely esetében a  $\sigma^B$  regulon növeli a baktériumok életképességét)? Feltételezhető volt, hogy amennyiben sikerül megismernünk a közvetlen jel természetét, választ találhatunk erre a kérdésre is.
3. Hogyan változik a *Bacillus subtilis* sejtfelszíni hidrofilitása stresszhatások esetén? Mivel *Salmonella typhi-murium*-ban és *Azospirillum* spp.-ben stresszhatásokra adott válaszként megváltozott a sejtek felszínének hidrofilitása, valószínűsíthető volt, hogy *Bacillus subtilis*-ben is létezik ez a fajta, sejtfelszíni szintű stresszválasz.

4. Amennyiben sikerül megfigyelni sejtfelszíni szintű stresszválaszt megvizsgálandó, hogy milyen főbb szabályozó mechanizmusok játszhatnak szerepet a hidrofilitás-változás kiváltásában. Erre nézve a különböző stresszfajták esetén megfigyelt hidrofilitás-változások mértékéből és kinetikájából remélünk információt kapni.
5. Mi a sejtfelszíni hidrofilitás-változások élettani szerepe?

### III. Anyagok, módszerek

#### 1. Felhasznált törzsek

A munka során az alábbi *Bacillus subtilis* törzseket használtam fel:

IS58 (*trp, lys*)

168 (*trp*)

ML6 (*trp, ΔsigB*); Hivatkozás: Völker et al., 1994.

QB4487 (*trp, ΔdegU*); Hivatkozás: Dartois et al., 1998.

1056 (*trp*)

A molekuláris genetikai munkákhoz az *Escherichia coli* DH5α törzsét használtam fel.

#### 2. A *sigB* és *gsiB* gének transzkripció analízise

Nem radioaktívan (digoxigenin) jelölt *sigB*- és *gsiB*-mRNS próbákkal végzett hibridizációval és denzitometriás kiértékeléssel történt.

#### 3. A sejtek ATP-pooljának meghatározása

A nukleotid extrakció TCA-módszerrel, míg a meghatározás Luciferáz-assay-el történt.

#### 4. A sejtek ATP- és GTP-pooljának együttes meghatározása

HPLC-vel, oktadecil-szilán alapú ioncserés oszlopon történt. Az elúció pH-gradienssel történt. Később e rendszer helyett a nukleotidok elválasztását

Whatman Partisil PXS 10 / 25 SAX oszlopon 25 °C-on végeztem, 0,1 M pH 6,0 Na-foszfát izokratikus elúciójával.

## 5. A sejtfelszíni hidrofilitás meghatározása

A sejtfelszíni hidrofilitás meghatározása hexadekán-extrakciós módszerrel történt.

## IV. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK

### 1. A $\sigma^B$ regulon indukciós szignálja, szerepe a baktériumban

Munkánk során elsőként megvizsgáltuk az intracelluláris ATP-koncentráció csökkenésének a  $\sigma^B$  regulon indukciójára gyakorolt hatását. Az ATP-koncentráció csökkentését a 2,4-dinitrofenol (2,4-DNP) szétkapcsolószerrel értük el. Bár a 2,4-DNP az ATP-koncentrációt viszonylag csekély mértékben (15 %-kal) csökkentette, mégis hatékony induktora volt a  $\sigma^B$  regulonnak. Éppen ezért nem volt kizárható, hogy a tapasztalt indukciót az ATP-dropot követő GTP-koncentráció esés okozza. Ezt a hatást először a mikofenolsav (MPS) nevű antibiotikummal vizsgáltuk, mely az IMP-dehidrogenáz és a GMP-szintetáz enzimek gátlószere. A kezelés igen kis mértékű  $\sigma^B$ -függő expresszió-növekedést okozott, bár a GTP-dropot követő (45 %-os) ATP-koncentráció esés jóval nagyobb volt a 2,4-DNP-nél tapasztaltnál. Az MPS által okozott kis mértékű indukció adenzin vagy guanozin tápoldathoz adásával ellensúlyozható volt. Mivel az MPS által okozott igen alacsony indukció nem erősítette meg illetve nem zárta ki egyértelműen a GTP-drop szerepét, ezért egy másik gátlószert, a decoyinine-t használtuk fel a következő kísérletben. A decoyinine a GMP-szintetázt gátolja, ugyanakkor (eddig fel nem tárt mechanizmus révén) nem okoz ATP-dropot. Bár méréseink igazolták, hogy a decoyinine kezelést követően ATP-koncentráció esés nem lépett fel, közepes mértékű  $\sigma^B$ -függő expresszió-növekedést tapasztaltunk, ami bizonyítja, hogy az ATP-koncentráció esés közvetlen jel szerepe kizárható. A decoyinine által okozott indukció guanozinnak a tápoldathoz adásával ellensúlyozható volt. Ez a kísérlet még azonban nem zárta ki, de nem is igazolta a GTP-drop közvetlen jel szerepét a  $\sigma^B$ -regulon aktiválásában, ezért megkíséreltük a 2,4-DNP

kezelés által okozott GTP-esést guanozinak a tápoldathoz adásával kiegyenlíteni. A vizsgált két teszt-gén közül a *gsiB* indukcióját a kiegyenlítés nélküli 2,4-DNP kezeléshez képest jelentősen csökkentette a guanozin-kiegyenlítés, a másik teszt-gén (*sigB*) indukcióját azonban nem befolyásolta. Ezek az eredmények azt valószínűsítik, hogy bár a GTP-drop szerepet játszik a  $\sigma^B$ -regulon indukciójában, valószínűleg nem ez a közvetlen jel. A GTP- és ATP-esés azonban hozzájárulhat az un- és misfolded fehérjék koncentrációjának intracelluláris növekedéséhez. Az un- és misfolded fehérjék pedig stressz-szignálként szolgálnak az *E. coli* hő sokk-válaszában (Bukau, 1993). Ezt a hatást a puromicin nevű antibiotikummal kívántuk modellezni *B. subtilis*-ben. A puromicin a transzláció elongációs fázisát blokkolja. A kezelés eredményképpen közepesen erős *sigB* és erős *gsiB* indukció volt megfigyelhető. Azonban az a tény, hogy ugyanakkor igen erős ATP-drop volt megfigyelhető, megkérdőjelezte a hibás konformációjú fehérjék szignál szerepét. Ezek jel-szerepének tisztázásához ugyanakkor még további kísérletek szükségesek. Feltűnő volt, hogy az eddigiek során a 2,4-DNP kezelés hatására következett be a  $\sigma^B$  regulon legnagyobb mértékű indukciója. Fontos megjegyezni, hogy a 2,4-DNP hatására nemcsak ATP-drop következett be, hanem –mivel a 2,4-DNP H<sup>+</sup>-ionokat szállít az extracelluláris térből a sejt belsejébe- intracelluláris savasodás és a sejt belsejébe irányuló + töltés transzport is. Ez utóbbi hatást kívántuk a valinomycin nevű, K<sup>+</sup> specifikus ionoforral vizsgálni. A valinomycin kezelést követően nem következett be ATP-drop, ugyanakkor az ionofor hatását jelezte, hogy az exponenciális növekedésű sejtek stacionális fázisba léptek. A *sigB* és a *gsiB* gének nagyon erősen indukálódtak valinomycin-kezelés hatására. Azt, hogy K<sup>+</sup>-terhelés specifikus volt-e az indukció, sav-stressz kísérletekkel vizsgáltuk, ekkor ugyanis H<sup>+</sup>-terhelésre számítottunk. pH = 6,0-nél a *sigB* viszonylag kismértékű, a *gsiB* viszont erős indukciót mutatott. Megjegyzendő, hogy a pH = 6,0 stressz enyhe sav-stressznek számít, mivel ez az első olyan savas pH-érték, ahol eltérés tapasztalható a pH= 7,5 értéken való növekedéshez képest. Lényeges pont, hogy a sav-stressz kísérletek során a  $\sigma^B$  regulonnal rendelkező sejtek gyorsabban nőttek a  $\Delta sigB$  mutánsnál pH = 6,0 – 5,0 között a korai stacionális fázisban. Ez volt az egyik első olyan fenotipikus különbség, amit sikerült a vad és a  $\sigma^B$ -mutáns sejtek között találni, és ami „globális” funkciót rendelt hozzá a szigma-faktorhoz: védettséget nyújt sav-stressz ellen. Az első „globális” funkciót a  $\sigma^B$  regulonhoz három, egy időben megjelent publikáció

rendelte hozzá: a  $\sigma^B$  regulon védetségét nyújt sav-stressz ellen *Listeria monocytogenes*-ben (Wiedmann et al., 1998 július), a  $\sigma^B$  regulon védetségét nyújt sav- és lúg stressz ellen *B. subtilis*-ben (Gadienko et al., 1998 július), illetve a  $\sigma^B$  regulon védetségét nyújt enyhe sav-stressz ellen *B. subtilis*-ben (Kovács et al., 1998 augusztus). A fenti kísérletek eredményei tehát a pH-stresszre irányították figyelmünket. Mivel valamennyi eddigi eredményünk, illetve a szakirodalomban fellelhető eredmények szerint az ATP-drop indukálja a  $\sigma^B$  regulont, célul tűztük ki, hogy úgy okozunk ATP-dropot, hogy közben lehetőleg ne indukáljuk a regulont. Amennyiben ugyanis ezt a célkitűzésünket sikerül megvalósítani, megtaláljuk a keresett közvetlen szignált, azaz (legalábbis energia-stressz esetén) a  $\sigma^B$ -függő indukció alapfeltételét. Ismert volt, hogy nagyon enyhe KOH stresszel el lehet érni, hogy a PMF gyengüljön, tehát ATP-drop jöjjön létre, azonban anélkül, hogy a sejt belső pH-ja megváltozna (köszönhetően a baktérium intracelluláris puffer-rendszereinek). Az általunk alkalmazott nagyon enyhe KOH-stressz hatékonyan csökkentette az ATP-poolt (nagyobb mértékű csökkenést okozott, mint a 2,4-dinitrofenol), azonban sem a *sigB* sem pedig a *gsiB* gén nem mutatott szignifikáns indukciót. Amennyiben megvizsgáljuk a munkánk során tapasztaltak illetve a szakirodalomban leírtak alapján azon stresszhatásokat, melyek a  $\sigma^B$ -regulon hatékony induktorai, bizonyossá válik, hogy az energia-stressz esetében szükséges az intracelluláris pH-változás, mely esetben savasodás szükségessége igazolt, a lúgosodás szerepe pedig valószínűsíthető.

## 2. Sejtfelszíni szintű stresszválasz

A stresszmentes körülmények között növekvő *B. subtilis* sejtek esetében megfigyelhető volt, hogy a sejtek felszíne a lag-periódusban és a stationáris fázisban hidrofílebb volt, mint a logaritmikus növekedés során. A körülmények megváltozása a baktériumok számára mindenképpen stresszhatást jelent, tehát nem volt kizárható, hogy az adaptációs periódusokban tapasztalt hidrofilitás-növekedés valamilyen stresszválasz volt. Ennek vizsgálatára a következőkben egyedi stresszhatások során mértük a sejtek felszíni hidrofilitásának változását. A következő stresszhatások esetén azt tapasztaltuk, hogy a baktériumok felszíni hidrofilitása eltért a kezeletlen kontrollhoz képest: hősokk, NaCl-stressz, foszfát- és glükóz éheztetés. Sav-stressz és oxigén-limitáció esetében -bár a stressz befolyásolta a baktériumok növekedését- nem sikerült a



kezeletlen kontroll sejt felszíni hidrofilitásához képest szignifikáns változást megfigyelnünk. Sóstresszt követően az eddig tapasztaltakhoz képest kiugróan nagy mértékű sejt felszíni hidrofilitás-növekedést tapasztaltunk. Mivel ismert tény, hogy a NaCl-stresszt *Bacillus subtilis*-ben elsősorban a DegS/DegU kétkomponensű rendszer érzékeli, a tapasztalt nagymértékű változás ráirányította figyelmünket erre a rendszerre. NaCl stressz esetén tapasztalataink szerint a vad (168) törzs és a *degU*-deléciós mutáns (QB4487) törzs felszíni hidrofilitása között szignifikáns különbség mutatkozott: a mutáns esetében jóval kisebb mértékben nőtt meg a sejtek felszíni hidrofilitása. Ez az eredmény arra utalt, hogy a DegS/DegU rendszer valamilyen szerepet játszik a sejt felszíni hidrofilitás-növekedésben. Ezt követően az egyik fő kérdés az volt, hogy a DegS/DegU rendszer jelenléte védeltséget nyújt-e az általunk alkalmazott sóstressz ellen. Rázatot tenyészetben szignifikáns eltérést a vad és a *degU*-mutáns törzs növekedése között NaCl stressz esetén nem tapasztaltunk. Ezzel szemben szilárd táptalajon a *degU*-mutáns sejtek kb. 7-szer jobban tolerálták a stresszt mint a vad típusúak, ami arra utalt, hogy a kitapadt sejteknél a DegS/DegU kétkomponensű rendszer jelenléte nem elsősorban a túlélést szolgálja sóstressz esetén, hanem valami egyéb funkciója lehet. Ez a funkció ugyanakkor nem kapcsolódik a sejtek felszíni hidrofilitásához, ugyanis lemezen a két törzs hidrofilitása között nem találtunk eltérést. Mivel a flagellin szintéziséért felelős gének a  $\sigma^D$  regulon tagjai, és ezek expressziója (közvetetten) a DegU foszforiláltságától függ, logikus volt feltételezni, hogy a sejt felszíni hidrofilitásban bekövetkező változások befolyásolják a sejtek motilitását, például a kitapadási tulajdonságok megváltoztatása révén. Kitapadási kísérletünkben bizonyítottuk, hogy NaCl stressz esetén a *degU* mutáns törzs tagjai jóval nagyobb mértékben (erősebben) tapadtak a szilárd hordozóhoz, mint a vad típusú baktériumok. Ennek alapján megállapítható, hogy a DegS/DegU rendszer által NaCl stressz esetén okozott hidrofilitás növekedés egyik fiziológiai szerepe a stresszelt baktériumok kitapadásának gátlása, miáltal azok motilitása nő. Ez logikus válasz a baktériumok részéről, hiszen amennyiben azok mozgékonyabbak, könnyebben el tudnak „menekülni” a talajban a stresszortól. Az MPS és 2,4-DNP kísérleteink eredményeképpen megállapítható, hogy az ATP- és / vagy GTP- koncentrációesés kiválthatja ugyan a sejt felszíni stresszválaszt, azonban jelenlétük nem feltétele a sejt felszíni stresszválasz létrejöttének.

A sejtfelszíni hidrofilitás-növekedés általános stresszválasznak tekintendő, ugyanis a tápanyag-éheztetési (a tápoldatban az adott tápanyag nem volt jelen) illetve  $-$ limitációs (a tápoldat csökkentett mennyiséget tartalmazott az adott tápanyagból) kísérletek során tapasztalt hidrofilitás-növekedés P-éhezés, P-limitáció illetve C-éhezés során nem mutatott szignifikáns különbséget.

## V. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK LISTÁJA

1. A GTP-koncentráció csökkenése szerepet játszik a  $\sigma^B$  regulon indukciójában, azonban valószínűleg ez nem számít „közvetlen” jelnek.
2. A  $\sigma^B$  regulon indukálásához energia-stressz esetén szükséges az intracelluláris pH-változás.
3. A  $\sigma^B$  jelenléte védelemet nyújt enyhe sav-stressz ellen.
4. *Bacillus subtilis*-ben is létezik sejtfelszíni szintű stresszválasz, mely különböző stresszfajták hatására megváltoztatja a sejtek felszínének hidrofíli-hidrofób jellegét.
5. NaCl stressz esetén a DegS/DegU kétkomponensű rendszer szerepet játszik a sejtfelszíni szintű stresszválasz kiváltásában.
6. A DegS/DegU kétkomponensű rendszer szükséges ahhoz, hogy NaCl stressz hatására a sejtek ne tapadjanak ki.
7. A DegS/DegU rendszer rázatott kultúrában nem nyújt védelemet NaCl stressz ellen, a kitapadt sejtek esetében pedig valamelyest csökkenti a baktériumok túlélési esélyét.
8. A sejtfelszíni stresszválasz az általános stresszválaszok közé sorolandó.
9. Az ATP- és / vagy GTP- koncentrációesés kiválthatja ugyan a sejtfelszíni stresszválaszt, azonban jelenlétük nem feltétele a sejtfelszíni stresszválasz létrejöttének.
10. Eredményeink gyakorlati alkalmazásaképpen két szabadalmi bejelentés született világszabadalmi igénnyel.

## VI. HIVATKOZOTT PUBLIKÁCIÓK

- Alper, S., Duncan, L., Losick, R. (1994) Cell 77, 195-205.  
Binnie, C., Lampe, M., Losick, R. (1986) Proc Natl Acad Sci USA 83, 5943-5947  
Boylan, S.A., Redfield, A.R., Brody, M.S., Price, C.W. (1993) J Bacteriol 175, 7931-7937.

- Bukau, B. (1993) *Mol. Microbiol.* 9, 671 – 680.
- Dartois, V., Debarbouille, M., Kunst, F., Rapoport, G. (1998) *J. Bacteriol.* 180, 1855 – 1861.
- van Dien, S.J., Keasling, J.D. (1998) *J. Theor. Biol.* 190, 37-49.
- Duncan, M.L., Kalman, S.S., Thomas, S.M., Price, C.W. (1987) *J. Bacteriol.* 169, 771-778.
- Gaidenko, T.A., Price, C.W. (1998) *J. Bacteriol.* 180, 3703-3733.
- Haldenwang, W.G. and Losick, R. (1980) *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 7000-7004.
- Hecker, M., Völker, U., Heim, C. (1989) *FEMS Lett* 58, 125-128.
- Hoch, J.A., Silhavy, T..J. (Eds.) (1995) *Two-component Signal Transduction.* : ASM Press
- von Kruger, W. M., Humphreys, S., Ketleym J.M. (1999) *Microbiology* 145, 2463 – 2475.
- Mach, H., Hecker, M. (1994) *Microbiology* 140, 741-752.
- Maul, B., Völker, U., Riethdorf, S., Engelmänn, S., Hecker, M. (1995) *Mol Gen Genet* 248, 114-120.
- Msadek, T. (1999) *Trends Microbiol.* 7, 201-207.
- Nixon, B.T., Ronson, C.W., Ausubel, F.M. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 7850 – 7854.
- Völker, U., Engelmänn, S., Maul, B., Riethdorf, S., Völker, A., Schmid, R., Wiedmann, M., Arvik, T.J., Hurley, R.J., Boor, K.J. (1998) *J. Bacteriol.* 180, 3650-3656.

## VII. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

### a.) Cikkek

- Kovács, T., Hargitai, A., Kovács, K.L., Mécs, I. (1998) pH-dependent activation of the alternative transcriptional factor  $\sigma^B$  in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 165, 323 – 328.
- Kovács, T., Bihari, Z., Hargitai, A., Mécs, I., Kovács, K.L. Stress-related changes of cell surface hydrophilicity in *Bacillus subtilis*, *Acta Microbiol. et Immunol.*, in press

### b.) Előadás

- Kovács T., Hargitai A. (1997) Changes in Hydrophobicity of *Bacillus subtilis* during various kinds of stresses. *Stress of Life*, Budapest

### c.) Szabadalmak

- Ládi, Zs., Kovács, T., Moórung, M. Schutzgasverpackung für Haushalte. Szabadalom száma: DE 19949190. (Európai Szabadalmi Hivatal)
- Ládi, Zs., Kovács, T., Moórung, M. Inhalationsgerät, bejelentés (Európai Szabadalmi Hivatal.)