

## Az exponenciális, kiegyensúlyozott növekedés

A mikroorganizmusok állandó környezetben exponenciálisan szaporodnak, amikor a sejtek száma (n) exponenciálisan növekszik:

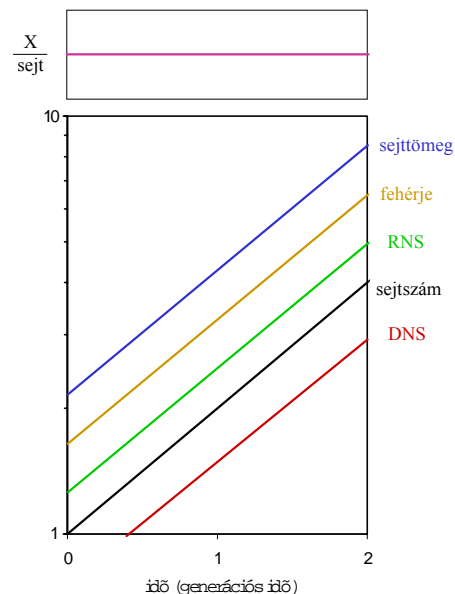
$$n = n_0 * e^{\mu * t}$$

Ha az exponenciális növekedést megfelelő ideig biztosítjuk, akkor a populációt alkotó sejtek átlagos mérete állandósul. Mivel a sejtek generációs időnként osztódnak, ezért meg kell duplázzák a citoplazmájuk tömegét ezen idő (ciklusidő) alatt. Ez csak úgy lehetséges, ha a sejteket alkotó minden egyes makromolekula (RNS, fehérje, DNS) mennyisége (jelöljük X-el) ugyanolyan exponenciális függvény szerint növekszik mint a sejtszám:

$$X = X_0 * e^{\mu * t}$$

A mikroba populációk növekedésének ez az egyetlen jól definiálható és egyben reprodukálható állapota, amit **exponenciális, kiegyensúlyozott növekedésnek (exponential balanced growth)** nevezünk. Az exponenciális, kiegyensúlyozott növekedés az exponenciálisan szaporodó rendszer "stacionárius" állapotaként fogható fel, mert ilyenkor az egyes komponensek egymáshoz viszonyított aránya és azok sejtenkénti koncentrációja nem változik.

Exponenciális, kiegyensúlyozott növekedés



## Az ideális koreloszlás

Egy exponenciálisan szaporodó tenyészetben a sejtek a sejtciklus különböző pontján tartózkodnak. kiegyensúlyozott növekedés állapotában lévő bináris osztódással szaporodó tenyészetben Mivel a sejt 2 utódot hoz létre, ezért

mindig kétszer annyi “baby” lesz, mint mama. A kettőjük között pedig exponenciális az átmenet (**koreloszlás**):

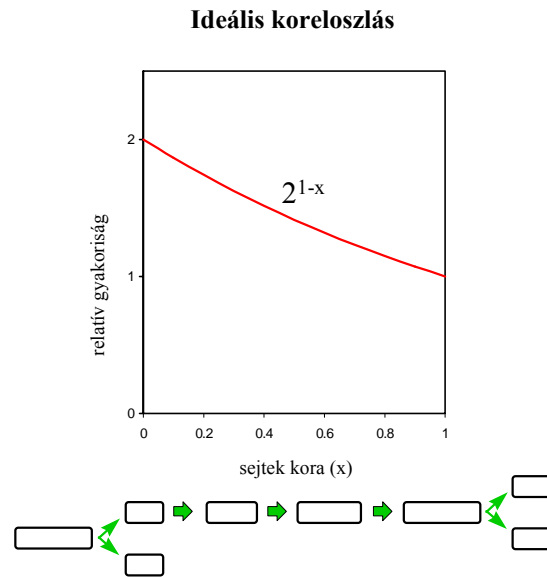
$$f(x) = 2^{1-x}$$

ahol  $x$  = a sejt ciklusbeli pozíciójával ( $t/t_g$ ). Ez az **ideális koreloszlás**: minden sejtnak egyforma generációs időt ( $t_g$ ) tételezünk fel.

### A növekedési sebesség hatása a fiziológiai állapotra

Általában minden élőlény gyorsabban növekszik jó tápanyag ellátás esetén. A tápanyagellátás hatása a növekedési sebességre azonban a mikroorganizmusoknál és ezen belül is a baktériumoknál a legszembetűnőbb. Egy

baktériumtenyészet növekedési sebessége ugyanis a tápanyag ellátás függvényében több nagyságrendet változhat. A baktériumok ugyanis úgy adaptálódnak a jó környezethez, hogy annak előnyeit maximálisan ki tudják használni. Ennek érdekében a baktériumsejt összetétele és mérete jellegzetesen változik a növekedési sebességgel. Az összetétel változásának bizonyos aspektusai magától értetődőek: a gyorsabban növekvő sejteknek nagyobb fehérje szintetizáló apparátusra van szükségük, de a felesleges apparátus már nem előnyös.



A tápanyagellátásnak a növekedési sebességre gyakorolt hatásának vizsgálata egyidős a mikrobiológia tudományával. A makromolekuláris összetétel változását a növekedési sebesség függvényében azonban csak 1958-ban ismerték fel. A növekedési sebesség okozta makromolekuláris összetétel változások **nem tápanyag specifikusak**. Egy bizonyos tápoldat az általa biztosított növekedési sebességen keresztül (közvetve) határozza meg a sejt összetételét (**fiziológiai állapotát**), nem pedig közvetlenül az összetételével. Így tehát **a sejtek fiziológiai állapota (összetétele) azonos**

**két eltérő tápoldatban, ha azok azonos növekedési sebességet biztosítanak.** Érdeemes azonban megjegyezni, hogy ha a szaporodás sebességét a hőmérséklet szabja meg, és nem a tápoldat összetétele, akkor a sejtek kémiai összetételében és méretében csak kevés változást lehet tapasztalni.

A különböző sejtkomponensek sejtenkénti mennyisége és a sejtek mérete (tömege és térfogata) jellegzetesen változik a növekedési sebesség függvényében. Konkrétan **minden jellemző exponenciálisan növekszik a növekedési sebességgel:** minél gyorsabban növekszik a sejt, annál többet tartalmaz az egyes komponensekből és annál nagyobb. Példaként tekintsük a *Salmonella typhimurium*mal kapott adatokat.

Láthatóan ezek nem elhanyagolható változások, és más baktériumok esetében is hasonló irányú és mértékű változások tapasztalhatók. Így pl. az *E.coli* kb. hatszor nagyobb (a térfogata) és 10-szer több RNS-t tartalmaz, amikor 24 perces generációs idővel szaporodik (2.5 duplázódást végez óránként), mint amikor 0.6-szor osztódik óránként (generációs idő 100 perc). Annál nagyobb a növekedési sebesség, minél rövidebb a generációs idő. Ezért a növekedési sebességet legegyszerűbben a generációs idő reciprokaként definiálhatjuk: a növekedési sebesség megadja, hogy egységnyi idő alatt hányszor osztódik a sejt. Az RNS tartalom változását az rRNS-ek koncentrációjában bekövetkező változás magyarázza elsősorban. Emlékezzünk, hogy az RNS-eknek stabil (rRNS és tRNS) és instabil (mRNS) formáit különböztettük meg. A mRNS-ek mennyisége (4%) elhanyagolható az össz RNS-ben. A stabil RNS-ek többsége (kb. 85%-a) pedig rRNS. A kísérletek tanúsága szerint a tRNS mennyisége is nő a növekedési sebességgel, de ennek jelentősége sokkal kisebb, mint az rRNS szintjének növekedése.

A gyorsan szaporodó sejtek nagyobb rRNS tartalmáról azok nagyszámú riboszómái is árulkodnak. Így pl. a 200 percenként osztódó *S. typhimurium* sejtek csak kb. 2000 riboszómát tartalmaznak, míg a 30 percenként osztódók 70 ezret. Mivel a riboszómák a fehérjeszintézisben vesznek részt, ezért ez már sejtetni engedi, hogy a nagyobb növekedési és szaporodási sebességgel járó fokozottabb fehérjeszintézis csak a riboszómák számának növelésével képzelhető el.

**Az egyes komponensek mennyisége nem azonos exponenciális kitevő szerint növekszik** a növekedési sebességgel. Ha az egyes komponensek logaritmusát ábrázoljuk a növekedési sebesség (a generációs idő reciproka) függvényében, egymással nem párhuzamos (eltérő meredekségű) egyeneseket kapunk. Leggyorsabban az RNS-k mennyisége növekszik (meredekség = 0.45), aztán a sejttömeg (meredekség = 0.31), a fehérje (meredekség = 0.28) és végül a DNS (meredekség = 0.23). Ennek következtében **az egyes komponensek aránya változik a növekedési sebességgel**: a gyorsan növekvő sejtek sokkal több RNS-t tartalmaznak, viszont relatíve (a sejt tömegére vonatkoztatva) kevesebb fehérjét és még kevesebb DNS-t. Abszolút értelemben természetesen a fehérje és a DNS szintje is emelkedik a növekedési sebességgel, csak kevésbé, mint a sejttömeg.

A sejtek RNS tartalmának növekedési sebesség függéséből meg lehet határozni a riboszómák sejtenkénti mennyiségét. Mivel a riboszómáknak a sejt fehérjetartalmát kell megszintetizálniuk egy generációs idő alatt, ezért a **fehérjeszintézis riboszómánkénti sebessége** is meghatározható. Ez tulajdonképpen a **láncnövekedés sebessége**. 0.5 és 2.5 óránkénti osztódások tartományában riboszómánként 16 aminosav polimerizálódik másodpercenként fehérjébe a növekedési sebességtől függetlenül. A riboszómák tehát konstans sebességgel dolgoznak, és a sejt riboszómái számát szabályozza a növekedési sebességtől függően.

Ha az RNS-tartalmat nulla növekedési sebességre extrapoláljuk, akkor 6%-os értéket kapunk. Ez tulajdonképpen azonos a sejtek mRNS-tartalmával. Tehát egy nem növekvő sejt tulajdonképpen nem tartalmaz rRNS-t és tRNS-t, hiszen nem is lenne rá szüksége.

### **A növekedés steady state állapotai közti átmenetek**

Ha különböző környezeti feltételekhez (és növekedési sebességekhez) különböző fiziológiai állapotok tartoznak, akkor a növekedési sebesség változtatását követően kell lennie egy ún. **tranziens** periódusnak, ami alatt a fiziológiai állapot az új környezetre jellemző értékre változik. A tenyészet fiziológiai állapotában bekövetkező változások a növekedési sebesség változtatását követően igen informatívak.

Ha egy lassan növekvő tenyészetnek hirtelen több tápanyagot adunk, akkor az gyorsabban fog növekedni és osztódni. Egy ilyen az ún. **fokozásos (shift-up) kísérletben** a legfeltűnőbb jelenség, hogy a ribonukleinsavak szintézise hirtelen megnövekszik. Kimutatták, hogy ilyenkor az RNS szintézis sebessége 5 sec-on belül megnövekszik, és 100 sec múlva már eléri az új állandó értéket. Azt is tudjuk, hogy ilyenkor alapvetően a rRNS-ek szintézise gyorsul meg. Ennek következtében a fokozást követő 30. percben a sejtek riboszóma koncentrációja eléri a gyorsabban növekvő sejtekre jellemző értéket. Természetesen ehhez azonban r-proteinek fokozott szintézisére is szükség van. A protein szintézis sebessége pedig csak a riboszómák számának megnövekedése után tapasztalható. A DNS és a sejtszám növekedése még egy ideig a régi sebességgel folyik, és csak később veszi fel az új értéket. Ennek következtében a relatíve kisebb DNS tartalom és a nagyobb sejtméret kialakul.

Az ellentétes kísérlet a **shift-down**, amikor a sejteket a gazdag (pl. komplett) tápoldatból kiszűrjük, és szegényebbe (pl. minimál) helyezzük. Ilyenkor fordított változások következnek be, mint az előbb. A sejtszám és a DNS növekedése egy ideig a régi értékkel folytatódik, míg az RNS-szintézis azonnal leáll. Az RNS szintézis leállítását a protein szintézis sebességének csökkenése követi. Mivel a sejtek gyorsabban állítják le az RNS- és fehérjeszintézisüket, mint a sejtosztódást, így jönnek létre a lassabb szaporodásra jellemző kisebb sejtek.

A riboszómák aminoacil-tRNS szükséglete nagy növekedési sebességeknél nagy: a sejt több mint fele fehérje, és ezt a mennyiséget 20 percenként meg kell duplázni. A növekedési sebesség csökkentését követően szinte azonnal az aminoacil-tRNS-ek mennyisége lecsökken és később a fehérjeszintézis sebessége is redukálódik. Érdekes módon azonban a stabil RNS fajták (tRNS és rRNS) szintézise is leáll, legalábbis egy rövid időre. A DNS replikáció folytatódik, de csak addig, amíg minden megkezdett replikáció be nem fejeződik. Új replikáció azonban nem indul. Amellett hogy a protein szintézis sebessége lecsökken, jellegzetes változás figyelhető meg a szintetizálódó fehérjék mintázatában: bizonyos fehérjék gyorsabban, mások pedig lassabban szintetizálódnak az átlagos sebességnél. Az aminosav szintézis enzimeit azok közt vannak, melyek gyorsabban szintetizálódnak az átlagnál. Az 50 riboszómális fehérje pedig lassabban szintetizálódik az átlagosnál. A riboszómák és a tRNS szintézisének gátlásával a sejt olyan folyamatokat állít le, amik energiaszükségletének 50%-át elfogyasztották.

Az aminosavak mennyisége egy idő után természetesen megemelkedik, mert szintézisük enzimeit nagyobb mennyiségben lesznek jelen.

### A stabil RNS-ek szintézisének szabályozása

A kérdés, amit most vizsgálunk, hogy mi okozza az rRNS-ek és a tRNS-ek szintézisének azonnali gátlását. Ezt a **központi gátlást szoros (stringent) kontrollnak** nevezzük. Ez a szabályozás a baktériumokban mindig bekövetkezik, ha gazdag táptalajból szegényebbe tesszük őket vagy egyszerűen megvonunk egy esszenciális tápanyagforrást. Ezt a szabályozást az 1950-es években fedezték fel, amikor egy olyan *E. coli* mutáns törzset találtak, ami ezt nem mutatta. Ezt a törzset **“laza” (relaxed) ellenőrzésűnek** nevezték el, a mutált gént pedig *relA*-nak. A *relA* mutáns az aminosav éhezést követően nem állította le az rRNS és a tRNS szintézisét. Amikor jó tápanyagellátású környezetbe helyezték vissza, akkor csak nagyon lassan tért magához, ami a szabályozás fontos szerepét bizonyította.

A tápanyag éhezés alkalmával 2 szokatlan nukleotid jelenik meg a sejtekben. Ezeket, mielőtt kémiai azonosításuk megtörtént volna, **mágikus foltoknak** (MSI és MSII) nevezték el. Kiderült, hogy ezek olyan GDP és GTP származékok, melyek 3'-pirofoszfát oldalláncokat viselnek. Nevük guanozin-tetra- és -pentafoszfátok, jelük pedig ppGpp és ppGppp. Ezek a vegyületek a *relA* mutánsban nem jelentek meg.

A ppGpp(p) szintézisének két módja van:

1. Ha a riboszóma egy olyan kodonon áll meg, amelyhez tartozó aminosav tRNS-e feltöltetlenül lép az A helyre, akkor a *relA* gén terméke aktiválódik, és ppGpp(p)-t termel. A *relA* terméke a ppGpp(p) szintetáz I, ami ATP-ből és GTP-ből termeli a guanozin-pentafoszfátot. A guanozin-tetrafoszfát pedig a ppGppp hidrolízisével keletkezik, ezt a folyamatot a *gpp* génterméke katalizálja. Mind a ppGpp-t, mind a ppGppp-t a *spoT* terméke (ppGpp(p) pirofoszfohidroláz) hidrolizálja el GDP-re ill. GTP-re.
2. A *relA* mutánsok szorost kontrollt mutatnak, ha energiaforrásra éheztenek őket, tehát a ppGpp(p) termelésének van egy *relA* független módja is. Az enzimet ppGpp(p) szintetáz II-nek nevezték el, és kiderült hogy ez a *spoT* terméke. Tehát a *spoT* terméke egy bifunkcionális enzim, ami szintézist és degradációt is katalizál.

A ppGpp(p) koncentrációjának növekedése gátolja az RNS polimerázt az rRNS és a tRNS gének átírásában. Így a riboszómás fehérjék nem tudnak rRNS-ekkel kapcsolódni, és leállítják önmaguk transzlációját.

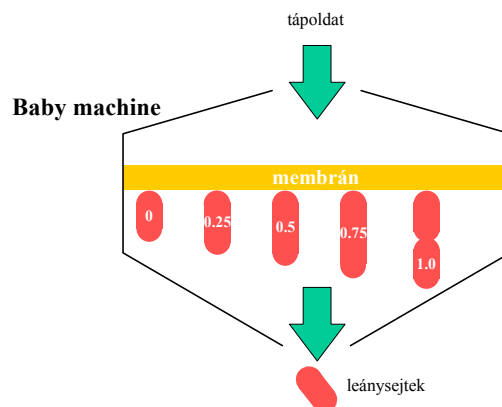
Baktériumokban a ppGpp(p) szintje negatív korrelációban van a növekedési sebességgel. Koncentrációja exponenciálisan szaporodó sejtekben 2-3-szoros értékre növekszik, ha a növekedési sebesség a negyedére csökken.

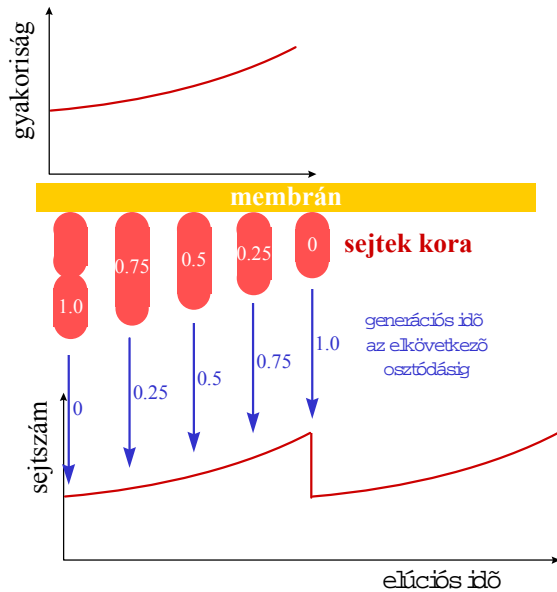
### A szoros kontroll szabályozási sémája

A szabályozásban a **stimulus** a tápanyag koncentráció csökkenése. A **szenzor** a relA tartalmú riboszóma, ami feltöltetlen tRNS-t tartalmaz. A **szignál** a ppGpp és a ppGppp, a **regulátor** pedig az RNS polimeráz.

### A DNS mennyiségének szabályozása

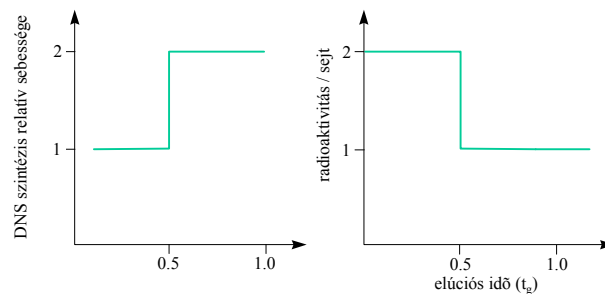
A DNS sejtenkénti mennyisége drámaian növekszik a növekedési sebességgel. Így pl. egy óránként 0.6 osztódást végző *E.coli* B/r tenyészetben az átlagos DNS tartalom 1.6 genom ekvivalens, míg 2.5 osztódás/óra értéknél 3.7 genom ekvivalens/sejt. Ez egy megdöbbentő adat, hiszen az eukarióta ciklus tárgyalásánál azt láttuk, hogy legalábbis haploid sejteknél a sejtenkénti DNS tartalom az S-fázis alatt az egyszeres értékről a kétszeresre növekszik (diploid sejtek esetén persze kétszeresről négyszeresre). Egy populáció átlagos sejtje tehát az egy- és kétszeres érték közötti DNS tartalommal rendelkezhet, de semmiképpen sem nagyobb. A baktériumok azonban kivételes sejtciklussal rendelkeznek.





A DNS replikáció szabályozását *E.coli* baktériumban Helmstetter & Cooper vizsgálták. Ehhez egy speciális membrán szelekciós szinkronizálási módszert használtak. Egy exponenciálisan szaporodó *E.coli* tenyészet sejtjeit egy speciális membránra szűrték, ahol a sejtek megtapadtak. Ezt követően a membránon folyamatosan tápoldatot áramoltattak át, ami az újonnan született sejteket lemosta a membránról. A kifolyó tápoldatban a sejtszám időbeli alakulása jellegzetes mintázatot követ. Az elúció kezdetén a azon sejtek utódjai válnak le a membránról akik a rögzítés pillanatában éppen osztódás előtt

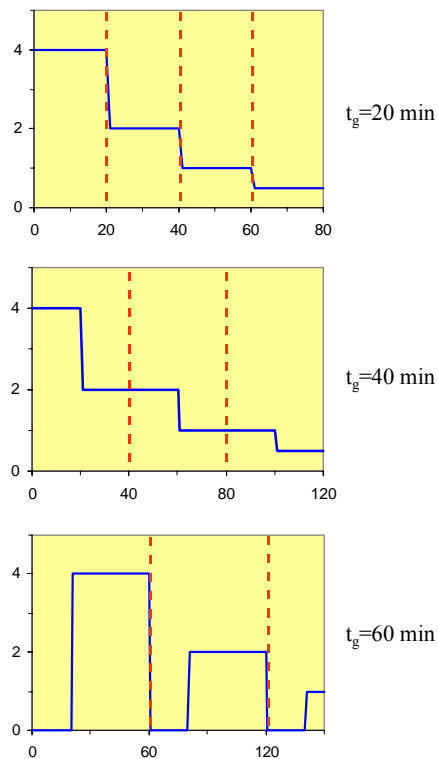
(sejtkor közel egy) álltak. Ezt követően pedig azon sejtek utódjai jelennek meg, akik a sejtciklus köztes állapotában voltak. Végül egy generációs idő múlva azon sejtek utódai jelennek meg, akik éppen a rögzítés pillanatában születtek. Mivel ilyen sejtekből éppen kétszer került a membránra, mint osztódás előtt állóból (ld. koreloszlás) ezért ezek kétszer annyi utódot is képeznek. Ennek következtében a sejtszám egy generációs időn keresztül folyamatosan növekszik. Egy generációs idő elteltével pedig hirtelen felére csökken az elfolyó tápoldat sejtszáma mert ismét a rögzítéskor egységnyi korú sejtek utódai mosódnak le a membránról.

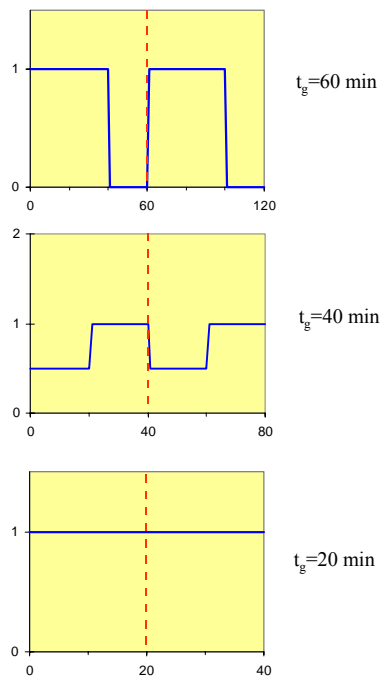




Ezzel a membrán elúciós módszerrel felvilágosítást lehet kapni a sejtciklus alatti történésekről. Helmstetter és Cooper a membránra való rögzítés előtt a sejteket triciált timidinnel jelölték, ami a DNS replikáció során a DNS-be épül be. Egy példa kapcsán nézzük meg miként alakul az elfolyó sejtekben a radioaktív jelölés mennyisége, ha a DNS szintézis sebessége a sejtciklus közepén (sejtkor=0,5) hirtelen megduplázódik. Ebben az esetben a 0,5 kornál idősebb sejtek kétszer annyi jelölést építenek be, mint a fiatalabbak. Mivel a membránról először a sejtciklus végén tartózkodó sejtek utódai válnak le, ezért a radioaktivitás időbeli mintázata pontosan tükörképe a sejtciklus alatti sebesség mintázatnak.

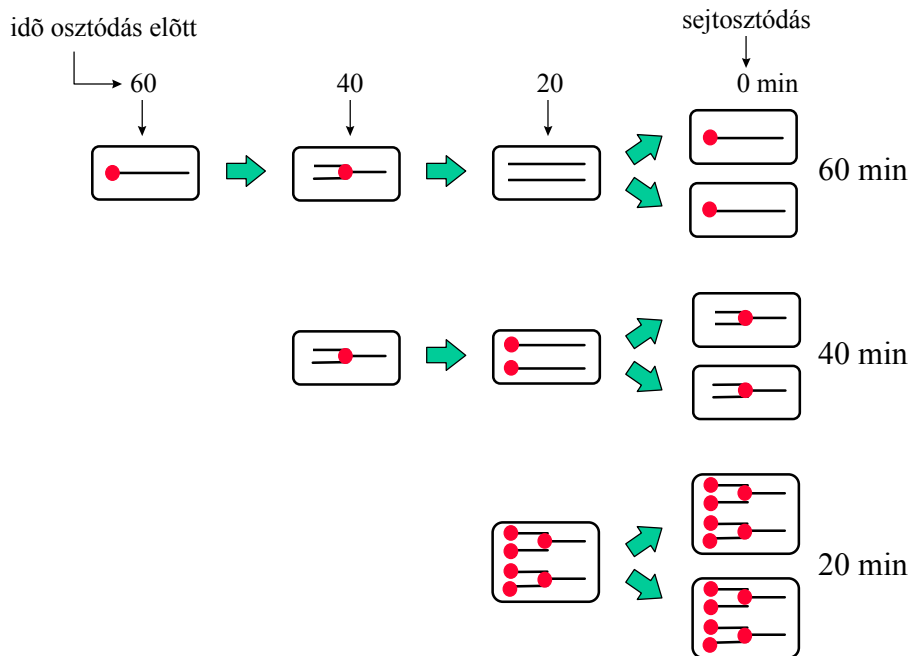
Helmstetter és Cooper a DNS replikáció szabályozását különböző növekedési sebességeknél vizsgálták, amit különböző szénforrásokkal biztosítottak. Az ábra 20, 40 és 60 perces generációs idővel szaporodó *E.coli* tenyészet DNS szintézisének adatait mutatja a membrán elúciós technikával. Láthatóan 60 percnél rövidebb generációs időnél a sejtek folyamatosan DNS-t szintetizálnak, vagyis a DNS replikációban nincs szünet. 60 perces generációs időnél a DNS replikáció pontosan osztódásnál kezdődik és a következő osztódás előtt fejeződik be 20 perccel. 40 perces generációs időnél pedig a ciklus közepén figyelhető meg a DNS szintézis sebességének fokozódása. 20 perces generációs időnél pedig ismét sejtosztódáskor indul a DNS replikáció.





Helmstetter & Cooper mérései szerint a DNS replikációjához az *E.coli* sejteiben óránkénti egy és három osztódás közötti tartományban 40 percre van szükség. Az a tény, hogy a **DNS lemásolásához szükséges idő a növekedési sebességtől függetlenül állandó, arra utal, hogy a replikációs villák konstans, maximális sebességgel dolgoznak.** Ha a sejt óránként egyszer osztódik, akkor generációs ideje 60 perc. Ha viszont 3-szor, akkor 20 perc. De hogyan osztódhat egy sejt sűrűbben, mint 40 perc (pl. 20 percenként), ha a DNS replikáció 40 percet vesz igénybe? A probléma

megoldása olyan egyszerű, mint hogy miként érkezhettek Londonból



utasok Edinburgh-ba egy óránként, ha az utazási idő vonattal 6 óra. A megoldás, hogy a vonatokat óránként indítják a londoni King's Cross vagy a Euston pályaudvarokról.

Mit jelent ez a bakteriális DNS szintézis vonatkozásában? A 40 perces generációs időnél gyorsabban szaporodó sejtek DNS-én egyszerre több replikációs villa dolgozik (hasonlóan a sínen egymás után haladó vonatokhoz). Hogyan lehetséges, hogy egy új replikáció indul, mielőtt az előző befejeződött volna? Ne felejtjük el, hogy prokariótáknál a DNS nincs sejtmagba zárva, és nincs mitózis sem. A replikálódott kromoszómák szeparálása fizikai membránvontatással valósul meg. A DNS a sejtmembránhoz kapcsolódik, és szintézisével párhuzamosan szeparálódik.

### I+C+D szabályok

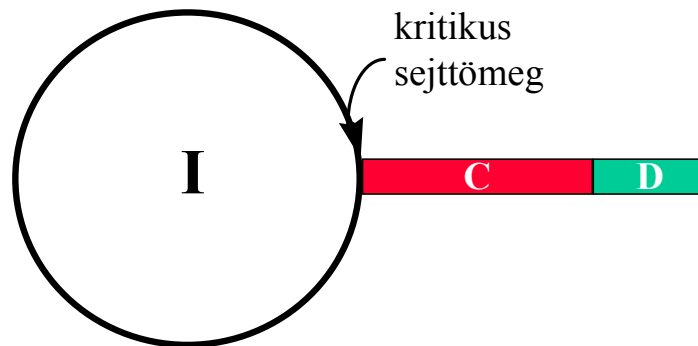
Látszólag a baktériumok sejtciklusa alapvetően különbözik az eukariótákétól. Ennek ellenére a bakteriális ciklus eleget tesz azoknak a követelményeknek, amiket az eukariótáknál fogalmazzunk meg. Nevezetesen a sejtosztódást megelőzően a sejtnek meg kell dupláznia a DNS tartalmát, és szegregálni kell a kromoszómákat. Az *E. coli*-ban a sejtosztódás előtt 20 perccel befejeződik a DNS-szintézis, amit **C-fázis**nak hívnak, és hossza 40 min (l. fent). A szegregáció befejezéséhez és az osztódás végrehajtásához ezután 20 percre van szükség, ez az ún. **D-fázis**. Ha a ciklus 60 percnél hosszabb, akkor van egy ún. **I-fázis** (intermedier) is, amikor sem duplikáció sem osztódás nincs. Ha a ciklus 60 percesre rövidül, akkor az I-fázis eltűnik, a ciklus két különálló fázisból áll: 40 perc C, majd 20 perc D.

Ha a ciklusidő 40 perc és 60 perc közötti, akkor nemcsak I-fázis nincs, hanem a **C- és D-fázisok egymásba csúsznak**, ugyanis rövidíteni egyiket sem lehet. Ez úgy lehetséges, hogy a D-fázisban is van replikáció, elindítódik az a C-fázis, amire már nem a jelenlegi sejtnek, hanem az utódainak lesz szüksége. Ennek a ciklusnak a végén a baktérium tehát több mint kétszeres genommal rendelkezik.

40 percnél is rövidebb ciklus esetén a **C-fázis teljesen folyamatossá** válik, a sejt egész élete során DNS-t szintetizál, de az utolsó 20 perc D-fázis is egyben ebben az esetben is. A C-fázis nemcsak a D-vel lapol át, hanem utódának C-fázisával is. A sejt tehát már a C-fázisban nem a saját, hanem az utódának fontos replikációt indítja el. A genom mennyisége a sejtben még nagyobb lesz ennek megfelelően.

Mi szabja meg a minimális ciklusidőt? A D-fázis hossza: 20 perc. Ennél rövidebb ciklus nem létezhet, mivel a D-fázis jellegénél fogva nem tud

átlapolni a következő D-fázissal. A 20 perces sejt ciklusa egyetlen folytonos



C- és ugyanakkor folytonos D-fázisból áll.

### A sejtméret szabályozó szerepe

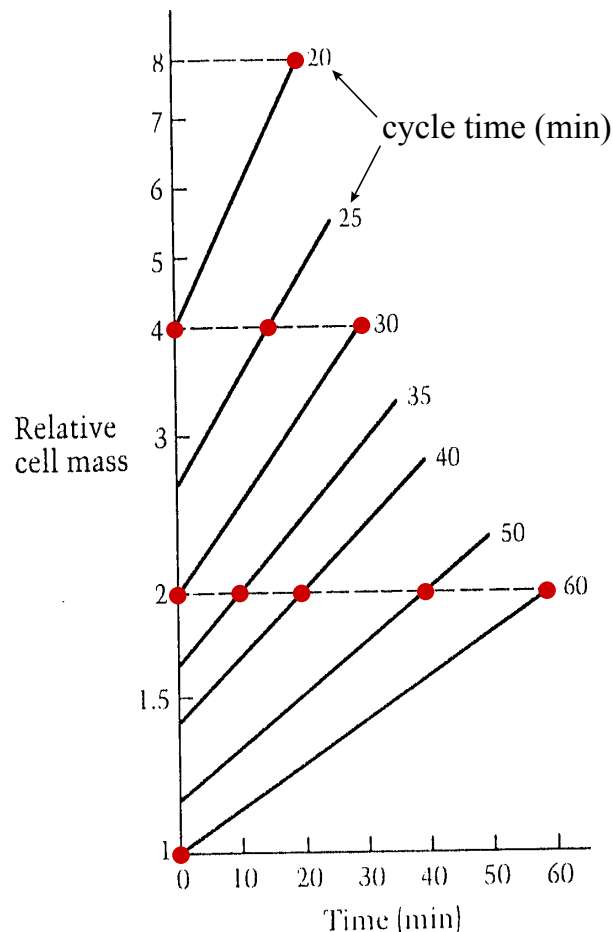
A baktériumok folyamatos DNS replikációja elmosza a hasonlóságot a pro- és eukarióta ciklus között. Willie Donachie szellemes analízise hívta fel a figyelmet arra, hogy hasonlóságok is vannak, pl. méretkontroll. Amint azt korábban láttuk, a gyorsabban növekvő baktériumsejtek sokkal nagyobbak, mint a lassabban növekvők. Miért ilyen nagyok a gyorsan szaporodó sejtek? Talán mert a gyorsabb növekedés több riboszómát, sőt több DNS-t és fehérjét igényel sejtenként, amihez nagyobb sejttérfogatra van szükség.

A sejtek térfogata a ciklus során exponenciálisan nő időben (mialatt megduplázódik), tehát a méret logaritmusát az idő függvényében ábrázolva egyenest kapunk. Minél gyorsabban növekvő sejtet ábrázolunk, a kapott egyenes tengelymetszete is, meredeksége is annál nagyobb lesz. A tengelymetszet ugyanis nem más, mint a születéskori méret; ez gyorsabban

növő sejténél nagyobb. A meredekség pedig azért nagyobb, mert a gyorsabban osztódó sejt hamarabb kell megduplázza méretét. Donachie először is ábrázolta egy közös koordinátarendszerben olyan sejtek méretének logaritmusát az idő függvényében, melyek ciklusideje 20 és 60 perc között különböző értékeket vett fel. **Minden sejt egyszer iniál DNS-szintézist a ciklus során pontosan 60 perccel (C + D) az osztódás előtt,** csak a 60 percnél rövidebb ciklusúak egyszerre több origót iniálnak. **A 60 perces ciklusú baktérium a ciklus elején iniál egy origót; az 50 perces ciklusú sejt 10 perccel osztódás előtt (10 + 50 = 60) iniál 2 origót az utódai számára, stb. A 30 perces ciklusú sejt a ciklus elején (30 + 30 = 60) iniál 2 origót, a 25 perces pedig 10 perccel osztódás előtt (10 + 25 + 25 = 60) négyet (!),** ugyanis ez a sejt már nem is a közvetlen utódairól, hanem az unokáiról gondoskodik.

Donachie minden egyenesen bejelölte az iniáció időpontját, és azt vette észre, hogy **a különböző sejtek azonos méretnél kezdik el a DNS-szintézist.** Tehát a

prokariótáknál éppúgy **méretkontroll** szabályozza a DNS-szintézist, mint az eukariótáknál: a sejtek csak akkor kezdenek bele, ha elérték egy kritikus méretet. Még szebbé tette a képet, hogy **a kritikus méret** nem volt konstans, hanem **lépcsőzetes mintázatot mutatott.** A 60 perces sejt a születés kori méreténél iniál. A 30 és 60 perc közötti sejtek azonos méretnél iniálnak, ami pont kétszerese a 60 perces sejt születés kori méretének. Miért a duplája? Azért mert ezek a sejtek két origót iniálnak



egyszerre, s ehhez kétszer akkora méretet kell elérjenek. Mi a helyzet a 20 és 30 perc közötti sejtekkel? Ezek is azonos méretnél iniciálnak, ami a 60 perces sejt kritikus méretének négyszerese (4 origó). Ha tehát a kritikus méretet elosztjuk az iniciált origók számával, minden *E. coli* sejt esetén ugyanazt az értéket kapjuk függetlenül a növekedési sebességtől (fiziológiai állapottól).