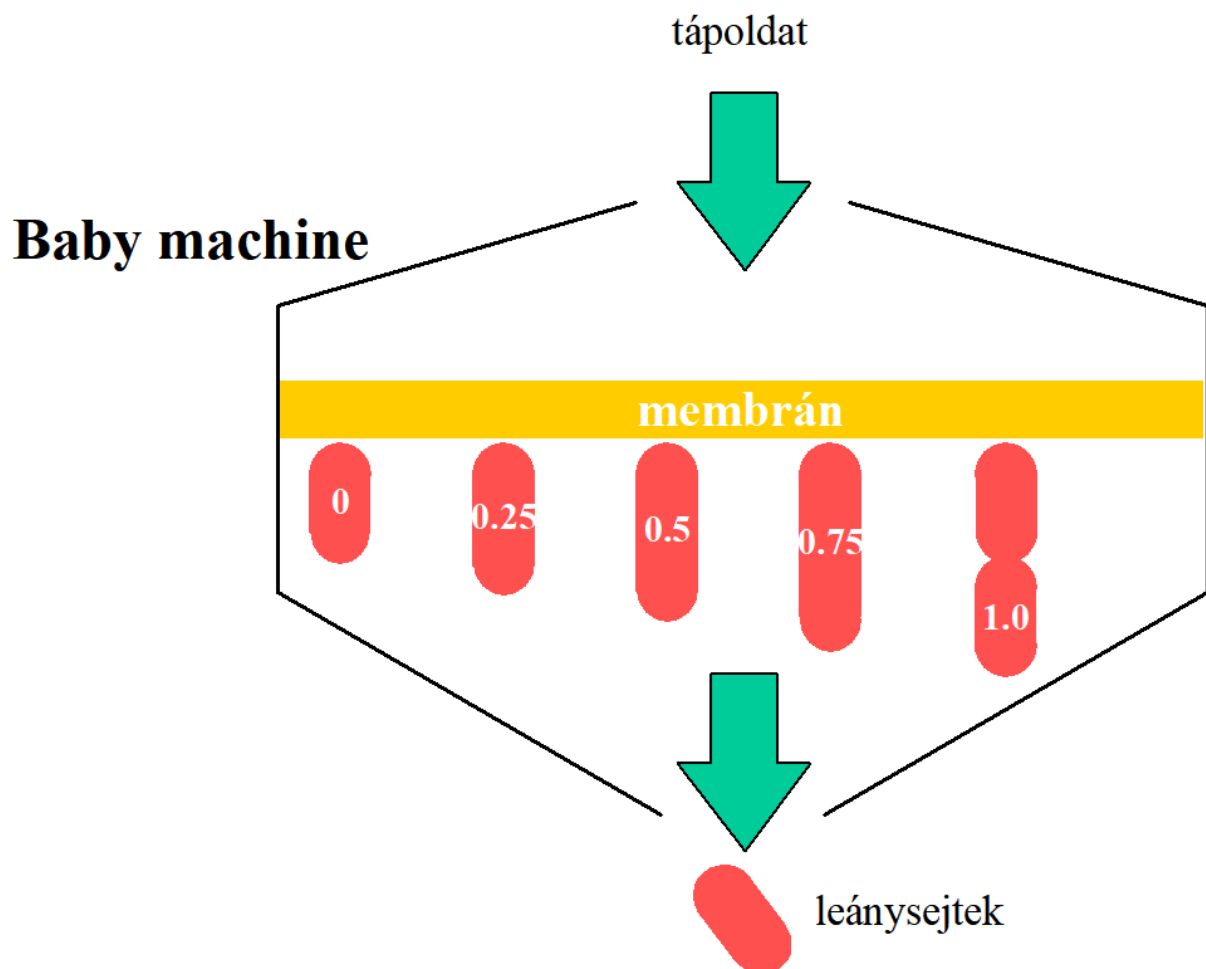


A replikáció szabályozása a baktériumok sejtciklusában; az I-, C- és D-fázisok és a méretkontroll szerepe baktériumoknál.

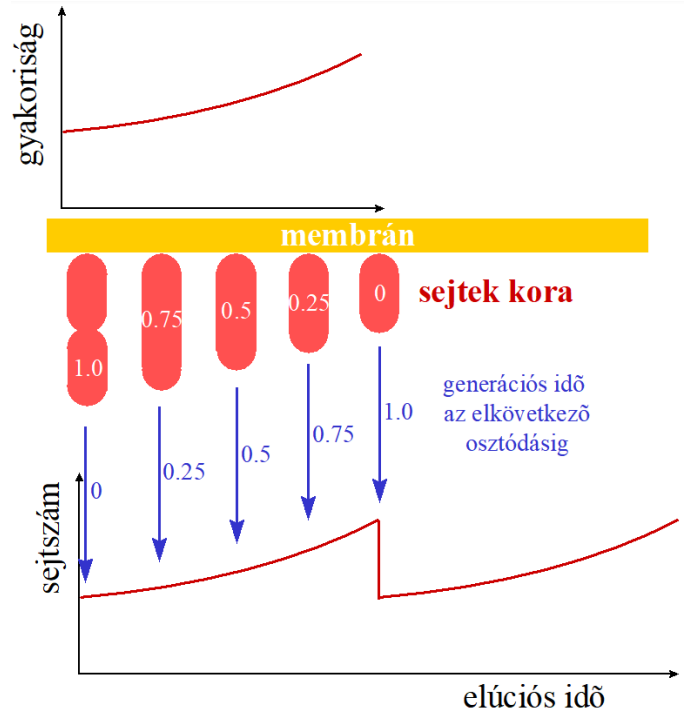
A replikáció szabályozása

Cooper kísérlete: egy **membránon rögzítenek egy sejttenyészetet**, majd tápoldatot folytatnak a membránon keresztül, amiről a rögzített sejtek nem tudnak leszakadni, de az utódok a szerkezetből kifolyó tápoldattal (**eluens**) kifolynak. Ez egy egyszerű **szinkronizációs** technika baktériumokhoz.



Az eluensben a sejtek mennyisége ciklikusan változik: folyamatosan exponenciálisan nő, de generációs időnként lefeleződik a mennyiség. E jelenség a **koreloszlásfüggvénnyel** magyarázható: Amikor a tenyészetet a membránra felvittük és rögzítettük a sejteket, velük együtt a koreloszlásukat is rögzítettük, lényegében a koreloszlásfüggvényen visszafelé mennek mindig az új osztódások (hiszen az utódok mindig kifolynak a rendszerből). A **koreloszlásfüggvény a görbe egy periódusának a periódus felére vett tükörképe**. A függvény periodikus, és egy **elúciós idő** a periódusa. Az elúciós idő megegyezik a generációs idővel.

Ezzel a módszerrel lehet kutatni, hogy bizonyos generációs idő mellett milyen intenzitású a replikáció. A kísérlet úgy zajlik le, hogy a membránon való rögzítés előtt **tríciumtartalmú timines tápközegben** tartják őket egy percig (impulzusjelölés), ezalatt a radioaktív timint **felveszik** azok a sejtek, **amelyek éppen replikálják** a DNS-üket. Tehát ezek a sejtek radioaktívak lesznek, a többi nem. Minél gyorsabb a replikáció, annál több timin épül be. Az eluens radioaktivitása arányos a felvett timin mennyiségével. A mért radioaktivitást egy sejtre kell vonatkoztatni, tehát a koreloszlásfüggvény szerint kell a mért adatokat korrigálni, tehát egyrészt az elúciós idő elejétől kell venni a függvényt, másrészt minden periódust (generációt) tükrözni kell a felére (és a generációkat külön kell vizsgálni). Ezáltal megkapjuk, hogy a sejt ciklusidejének melyik részében, milyen intenzitással replikált. (Ezenkívül a zajtól is meg kell szabadulni, ami abból adódik, hogy minimális mennyiségű tríciumos timint minden sejt felvesz a replikációtól függetlenül.)



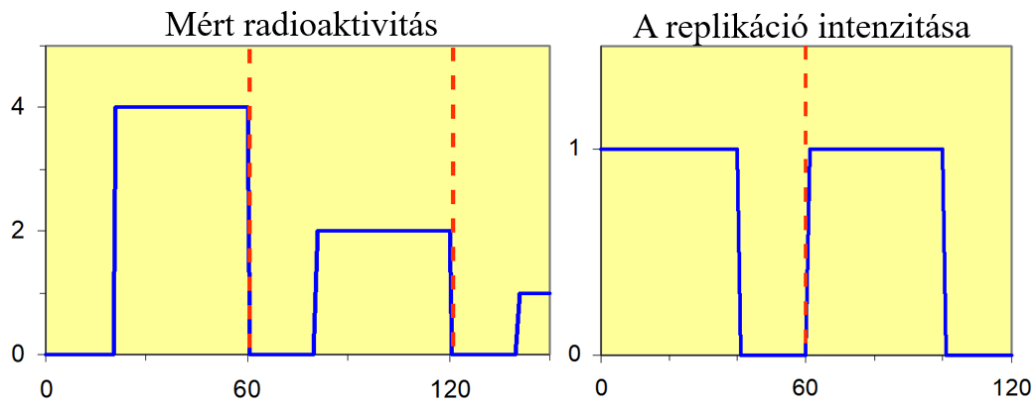
Ha **radioaktivitás lefeleződik**, az azt jelenti, hogy a **replikáció sebessége megkétszereződött**. Ez pedig csak akkor történhet meg, ha **új replikációs villa nyílik a DNS-en** (prokariótáknak csak egy replikációs origója van, tehát ugyanaz nyílik fel újra).

Kísérlet E. colival

60 perces generációs idejű sejtek:

A radioaktivitás 20 percig nem észlelhető, majd 40 percig megugrik. A következő ciklusban ugyanez történik, de az előző radioaktivitásnak csak a felét éri el (a szemikonzervatív replikáció miatt a radioaktív timin fele a **baby machine**-ben marad, ezt a replikációsebességre való átírásnál ki kell küszöbölni).

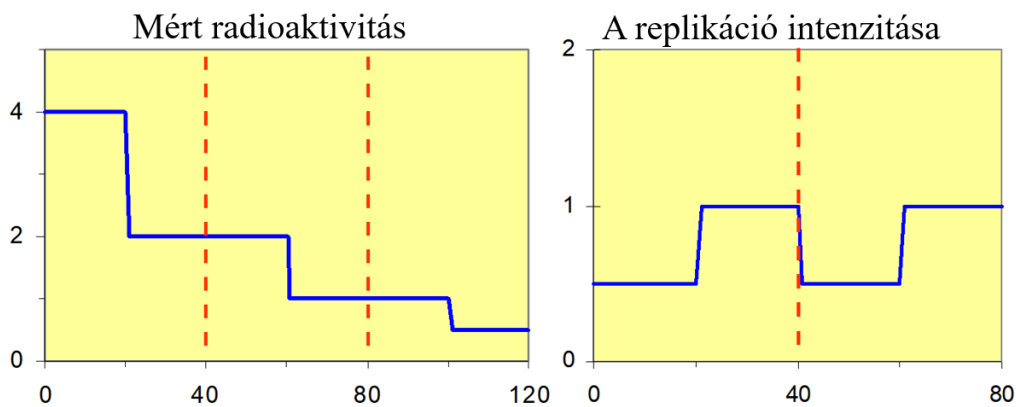
Ebből kikövetkeztethető, hogy az első 40 percen állandó intenzitással replikál a sejt, a maradék 20 percen már nem.



40 perces generációs idejű sejtek:

A radioaktivitás 20 percig magas értékű, majd 20 percig feleakkora. A ciklus alatt a radioaktivitás mindig több, mint 0 (a szemikonzervatív replikáció itt is érvényesül).

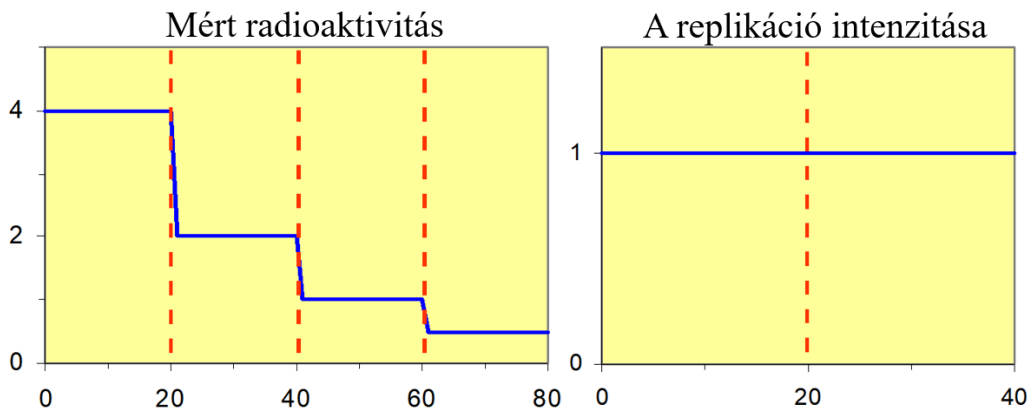
Ebből kikövetkeztethető, hogy az első 20 percen állandó intenzitással replikál a sejt, a következő 20 percen kétszer olyan gyorsan.



20 perces generációs idejű sejtek:

A radioaktivitás végig ugyanolyan magas értékű, a generációs idő végén lefeleződik (a szemikonzervatív replikáció miatt). A ciklus alatt a radioaktivitás mindig több, mint 0 és nem változik.

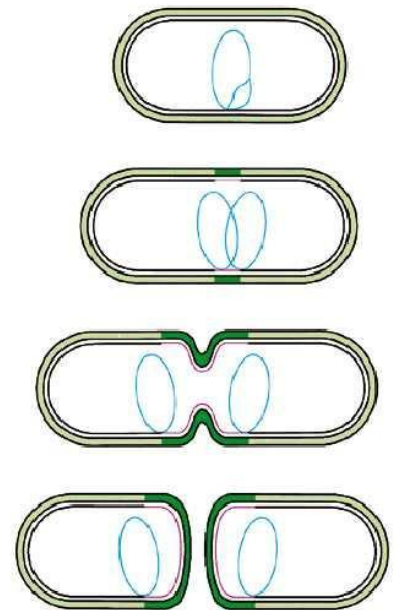
Ebből kikövetkeztethető, hogy a replikáció intenzitása végig ugyanolyan szintű.



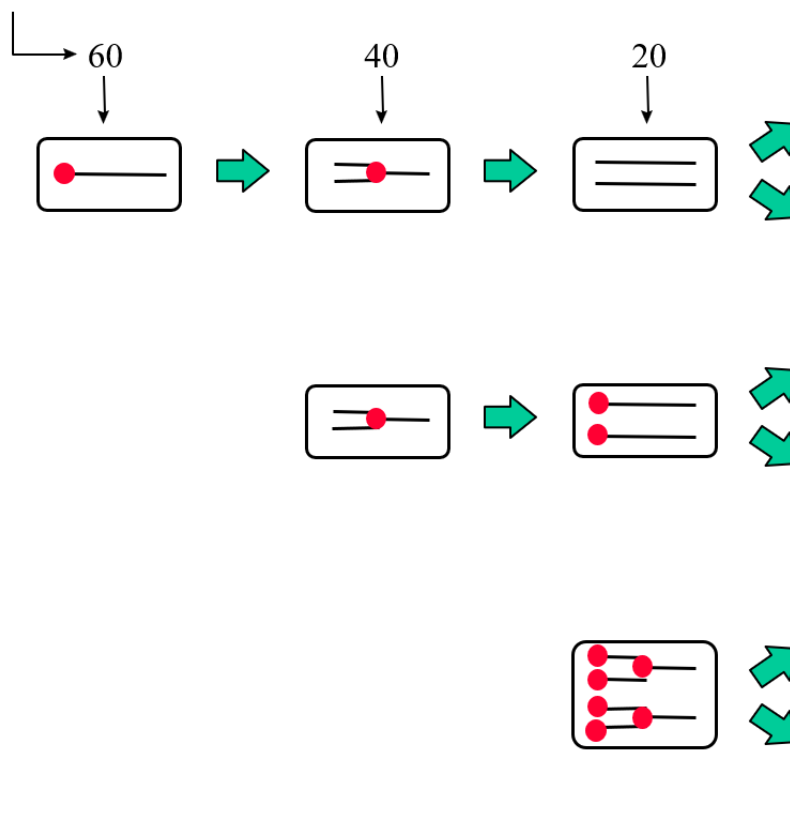
A tapasztalatok magyarázata:

Alapvetően az E. coli egy haploid sejt, egyetlen cirkuláris kromoszómával. Mivel nincs sejtmagja, nem kell elkülönítenie a replikációt és az osztódást.

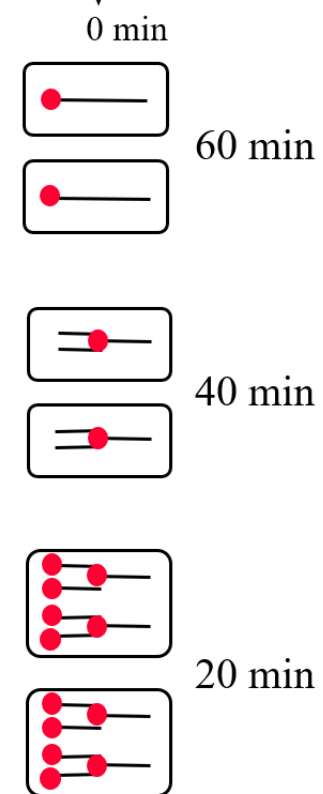
Replikáció után megkezdődik a szeptáció, a két utódnukleoid a két jövőbeli utódsejt plazmájába megy (bakteriális sejtváza és a nukleoid membránra való kitapadása által), majd a szeptáció befejeződik. Viszont semmi sem tiltja, hogy miután a két utódnukleoid egymástól elvált és a szeptáció elkezdődött, új origó tüzeljen. Tehát még nem vált el a két utód, technikailag egy egyedről beszélünk, de már a sejt több, mint diploid. A lényeg csak annyi, hogy **az éppen született sejt és a belőle kifejlődő utód a replikáció ugyanazon pontján tartson**. Egyetlen megkötés van csak: mivel a szeptáció 20 percig tart, egy replikációt a sejtnek be kell fejeznie osztódás előtt 20 perccel. De hogy addig hányat indíthat el, azt a generációs idő szabja meg.



idő osztódás előtt



sejtosztódás



Ez a magyarázata annak, hogy a sejtek DNS-tartalma elérheti a 60 perces ciklusidejű baktérium DNS-tartalmának 2,5-szeresét is.

A bakteriális sejtciklus

I-fázis: a generációs idő maradék részét tölti ki, amikor se C, se D fázis nem történik. Mindig annyi ideig tart, hogy $T_g = I + C + D$ (sorrendben is így követik egymást) igaz legyen.

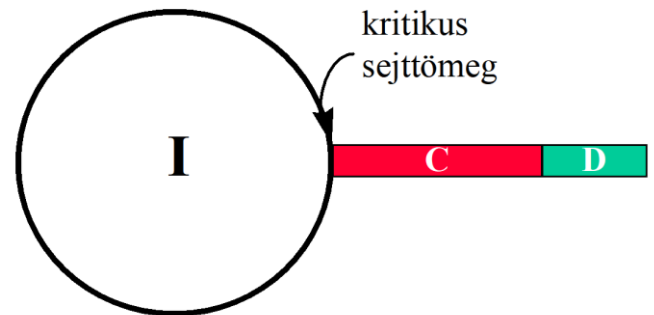
C-fázis: ennyi idő kell a **DNS megkettőzéséhez**. E. coliban ez 40 percig tart (ha nem túl hosszú a generációs idő).

D-fázis: ennyi idő kell a kromoszómák szegregációjához és a **szeptációhoz**. E. coliban ez 20 percig tart (ha T_g nem túl hosszú).

Ha túl hosszú a generációs idő, a C- és D-fázisok hossza megnyúlik.

D- és C-fázis alatt el lehet kezdeni C-fázist, tehát az n-edik generáció alatt el lehet kezdeni az n+1-edik generáció C-fázisát.

D-fázis alatt nem lehet új D-fázist elkezdni, ezért a generációs idő minimumát a D-fázis hossza szabja meg.



Donachie kísérlete:

A **C-fázis elején méretkontroll** van (olyasmi, mint az eukarióták startpontjában), **az origók mindig egy adott méretnél kezdenek tüzelni**. A tapasztalat az volt, hogy 60 perces generációs időnél egy bizonyos sejtméretnél kezdett az origó tüzelni, és egy origó tüzelt ilyenkor a sejtben. 30 és 59 perc közötti generációs időnél mindig ugyanannál a sejtméretnél tüzelt egyszerre két origó, de ez a sejtméret más volt, mint a 60 (és több) percesnél, ráadásul éppen kétszer akkora volt a sejtméret. 20 és 29 perc között már négy origó tüzelt egyszerre egy új, a 60 perces generációs idejű sejtbe képest négyszeres sejtméretnél.

Következtetés: egy origó tüzeléséhez egy 60 perces sejtméret (mostantól sm) szükséges, n origó tüzeléséhez pedig n sm szükséges (n gyakorlatilag csak 1, 2 vagy 4 lehet).

