

A FÁK HOSSZÚ ÉLETÉNEK TITKA

Bernáth Szabolcs^{1,*}, Szöllösi Gergely János^{1,2}, Derényi Imre¹

¹Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Biológiai Fizika Tanszék, Budapest

²Okinawa Institute of Science and Technology, Model-Based Evolutionary Genomics Unit, Okinawa, Japan

*E-mail: bernathsz@student.elte.hu

A fák rendkívüli élettartama evolúciós és sejtbiológiai szempontból is különleges jelenség, hiszen a sejtek osztódásainak melléktermékeként megjelenő mutációk az évek során felhalmozódva a sejtek működésének fokozatos leépüléséhez vezethetnek. Ennek ellenére a fák hosszú életük során is megőrzik genomjuk stabilitását, ami a csúcsrügyekben található összejtek sajátos osztódási dinamikájának köszönhető. Egy friss, teljesgenom-szekvenálási vizsgálat adatait újraelemelve, valós mutációs mintázati példákon keresztül mutatjuk be, hogy a fák összejtjei milyen dinamikát követnek annak érdekében, hogy minimalizálják az osztódásaik számát.

Bevezetés

A szövetes növények (Tracheophyta) élettartama rendkívül szerteágazó. Találkozhatunk egynyári fajokkal (pl. kukorica, görögdinnye, zöldborsó), illetve olyanokkal, amelyek több száz, akár több ezer évig is képesek élni (pl. egyes tölveleűek). Érdekes azonban, hogy fejlődésükben ezek a növények nagyon hasonlóak. Mindegyikük hajtásának csúcán található egy csúcsrügy (apikális rügy), melyben egy merisztéma nevű parányi szövet tartalmazza a növény összejtjeit. Össejteknek nevezzük azokat a differenciálatlan sejteket, amelyek osztódással képesek

akár újabb összejteket vagy differenciált (specifikusabb) sejteket létrehozni. Ezek az összejtek biztosítják a növény élethosszig tartó növekedését, valamint az oldalsó rügyek (axilláris rügyek) kialakulását. A rügyekből fejlődnek ki az új hajtások, virágok és termések, vagyis a növény majdnem minden szövete végső soron a csúcsrügyek összejtjeiből származik. Kivételt képeznek a gyökérszövetek, melyek a gyökércsúcsok összejtjeiből származnak. Az összejtek tehát kulcsszerepet játszanak a növény fejlődésében, de egyben hordozzák annak veszélyét is, hogy az évek során genetikai hibák, mutációk halmozódhatnak



Bernáth Szabolcs az ELTE Biológiai Fizika Tanszékének doktorandusza. Kutatási területe az élő szervezetek szomatikus evolúciójának vizsgálata a genetikai állományban azonosított mutációkon keresztül, valamint összejtosztódási mechanizmusok modellezése.



Szöllösi Gergely János az ELTE Biológiai Fizika Tanszékének adjunktusa és az Okinawa Tudományos és Technológiai Intézet professzora, ahol jelenleg a Modellalapú Evolúciós Genomikai Egységet vezeti. Kutatási területe genomevolúciós modellek fejlesztése és alkalmazása, valamint a szomatikus evolúció analitikus modellezése és sztochasztikus szimulációja.



Derényi Imre az ELTE Biológiai Fizika Tanszékének professzora, az MTA levelező tagja. Kutatási területe molekuláris motorfehérjék működésének értelmezése, sejtek és biológiai membránok dinamikájának vizsgálata, valamint szomatikus evolúciós folyamatok modellezése.

fel bennük. Ez pedig az őssejtek előregedéséhez és a belőlük származó szövetek leromlásához vezet.

Egyetlen év alatt egy fa ágán számos új oldalrügy keletkezik. Ezek szerkezetileg azonosak a csúcsrügyekkel, hiszen bármelyikben megvan a képesség, hogy új hajtást (ágot) indítson, és így maga is csúcsrüggyé váljon. Többségük mindaddig alvó állapotban marad, amíg hormonális vagy környezeti jelek (például az eredeti csúcsrügy sérülése) növekedésre nem készítenek. Minden új oldalrügy létrejötté ezért a csúcsrügy őssejtjeinek osztódását igényli. Bár az osztódás során fellépő DNS-replikáció rendkívül pontos, időnként mégis hiba csúszik a folyamatba, elromlik az eredeti bázisrend, azaz mutációk jelennek meg. Azt gondolnánk, hogy egy több száz évig élő fa hatalmas mennyiségű mutációt gyűjt, azonban a kísérleti tapasztalat nem ezt mutatja. Egy néhány éve megjelent tanulmányban [1] egy 234 éves tölgyfa két ágáról vett levélminták génállományát szekvenáltak (azaz olvasták le a genetikai információikat). Ebből kiderült, hogy a két ág között csupán néhány tucatnyi (de legfeljebb 50) mutációs eltérés található. Hogyan lehetséges az, hogy egy fa több évszázadon keresztül képes megőrizni genomjának stabilitását, miközben folyamatosan növekszik és új szöveteket hoz létre? A tölgyfa genomja kb. $0,8 \cdot 10^9$ bázispár hosszúságú. Ezt beszorozva a kb. $0,3 \cdot 10^{-9}$ /bázispár osztódásonkénti mutációs gyakorisággal kapjuk, hogy az egy sejtosztódásra jutó mutációk száma körülbelül 0,24. Ha mindkét ág a szétválásuk óta legfeljebb 25-25 mutációt halmozott fel, akkor az azt jelenti, hogy az őssejtjeik legfeljebb $25/0,24 \approx 100$ sejtosztódáson mentek keresztül. Ez döbbenetesen kevés ahhoz képest, hogy ezalatt az idő alatt akár több ezer oldalrügy képződhetett. Felmerül a kérdés, hogy milyen különleges osztódási dinamikát követnek az őssejtek, hogy ily mértékben képesek minimalizálni az osztódásaik számát és ezzel együtt a mutációk felhalmozódását.

Ezt a kérdést mindmáig nem sikerült teljes mértékben megválaszolni, mivel a csúcsrügy őssejtjeinek nyomon követése rendkívül nehéz feladat. Az őssejtek morfológiailag alig különböztethetők meg a környező sejtektől, ezért az azonosításukhoz speciális molekuláris jelölőkre van szükség, amelyekkel az őssejtekre jellemző génexpresszió kimutatható. A mikroszkópos vizsgálatokhoz pedig metszetek készítése szükséges, ami a szövetek roncsolásával jár.

Mutációk, sejtvonalak azonosítása

Az elmúlt évtizedekben hatalmas fejlődés ment végbe a génszekvenálási technológiákban. Ma már gyorsan, olcsón és viszonylag egyszerűen tudunk teljes genomokat szekvenálni (leolvasni), ami korábban elképzelhetetlen mennyiségű adatot eredményez. Mindezeket optimalizált algoritmusokkal erős számítógépeken hatékonyan tudjuk feldolgozni, így ma olyan kérdéseket is vizsgálhatunk, amelyek korábban technikailag elérhetetlenek voltak. Ennek köszönhetően kutathatjuk a növényekben

felhalmozódó mutációkat, hogy visszakövessük azok eredetét egészen a kiindulási (csírázáskori) őssejtjeikig. Mivel a növényekben minden sejt őssejtekből keletkezik, egy őssejtben bekövetkező mutáció minden leszármazott sejtire átöröklődik, és minden új őssejtmutáció egy-egy külön sejtvonalat hoz létre. A mutációk így közvetlen lenyomatai az őssejtek osztódási dinamikájának és leszármazási történetének. Az így kirajzolódó sejtvonalmintázatokból következtetni lehet a csúcsrügyek őssejtjeinek számára, osztódási mechanizmusaira, valamint arra is, hogy hány különböző őssejt járul hozzá például egy új oldalrügy kialakításához. A mutációk feltérképezése tehát lehetőséget teremt arra, hogy feltárjuk az egyed fejlődési történetét – hasonlóan ahhoz, ahogyan a fajok genetikai mintázatai segítségével tárható fel az élővilág törzsfelődése, csak itt mindez egyetlen élőlényen belül történik.

A többsejtű állatok (és az emberek) esetében meg szokás különböztetni a testi (szomatikus) sejteket a csíravonal sejtjeitől. Az öröklődés szempontjából nem mindegy, hogy melyikben milyen mértékben halmozódnak a mutációk. Éppen ezért a csíravonal, mely a hímivarsejteket és petesejteket tartalmazza, korán elkülönül a szomatikus sejtektől. A növények esetében azonban nem tudjuk, létezik-e egyáltalán elkülönült csíravonal [2]. De ennek nincs is jelentősége, hiszen ha létezne is csíravonal, a sejtjei a többi őssejthez hasonlóan kellene hogy kövessék a rügyek keletkezését annak érdekében, hogy minimalizálják a mutációk felhalmozódását. Ennek következtében akár generatív úton (magképződéssel), akár vegetatív úton (például hajtásokkal, mint a rózsza, vagy indákkal, mint a szamóca) szaporodik egy növény, viszonylag kevés mutációt örökít át az utódokra.

Az elmúlt években megjelent néhány tanulmány, ami különböző növények mutációit vizsgálta. A tanulmányokban rendre a növények valamilyen differenciált szövetét: levelet, rügyet, termést szekvenáltak. Egy ilyen vizsgálat során az adott mintában nem egy-egy sejt genetikai kódját határozzák meg, hanem több sejtét összekeverve. Ez képet adhat arról, hogy a minta milyen típusú őssejtekből keletkezhetett, és legalább hány őssejt járult hozzá a mintához tartozó szövet képzéséhez. Fontos megemlíteni, hogy a rügyek merisztémáiban három őssejtréteg különböztethető meg. Az L1 réteg a növény felszínét borító epidermiszt hozza létre, az L2 főként az epidermisz alatt található, kloroplasztban gazdag mezofillumsejteket adja, míg az L3 a szár- és szállítószövetek (xilém és floém) fejlődéséért felelős. Bár ezek a rétegek morfológiailag elkülönülnek, nem ismert, hogy mennyire önfenntartóak, esetleg cserélődnek-e sejtek a rétegek közt. Korábbi tanulmányokból kiderült, hogy a levél mind a három őssejtréteg leszármazottjait tartalmazza, a termés héja az L1 rétegből, a termés húsa pedig az L2 rétegből eredeztethető. Ha tehát egy levélmintát szekvenálunk, és elemezzük a mutációit, legalább három őssejt leszármazottaival fogunk találkozni. Azért legalább három, mert lehet, hogy egy sejtrétegből két vagy több genetikailag különböző őssejt is hozzájárul a szövet kialakításához.

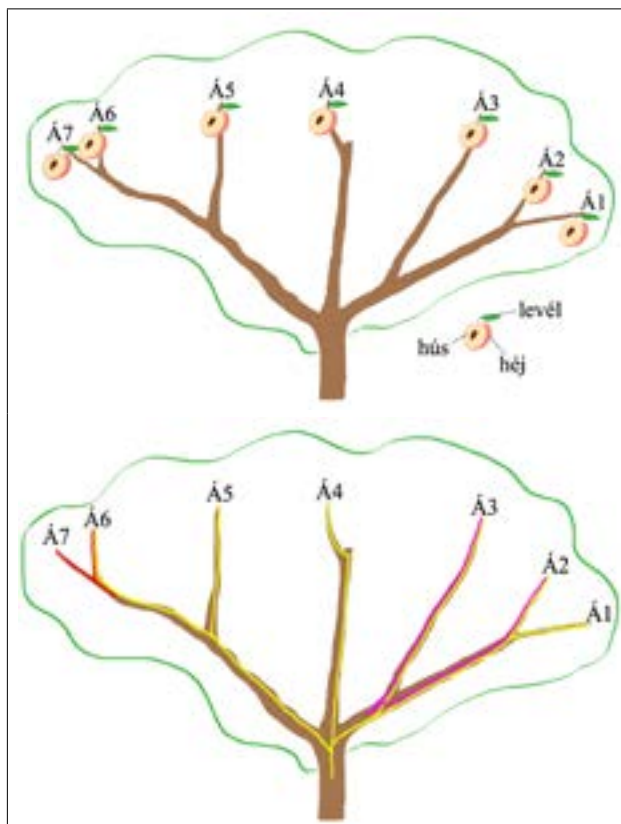
Mindezt úgy tudjuk meghatározni, ha azonosítjuk a minta DNS-ében fellelhető mutációkat. Ehhez először a sejtek DNS-ét ki kell nyerni, majd szekvenálni (leolvasni a bázissorrendet). A szekvenálási folyamat során a DNS-t rövid részekre vágjuk. Ezeket a rövid DNS-szakaszokat nevezzük olvasatoknak (read-eknek). Itt fontos kiemelni, hogy különbség van aközött, hogy egy eddig ismeretlen élőlény DNS-ét akarjuk meghatározni, vagy egy már ismert DNS-sel (referenciagenommal) akarjuk összehasonlítani a mintánkat. Az előbbi esetben általában minél hosszabb (néhány ezertől százezer bázisig) szakaszokra vágjuk a genetikai állományt, az utóbbiban általában rövidebb (50–500 bázis) szakaszokra, amit felsokszorosítunk. Ezután az elvágott és felsokszorosított szakaszok bázissorrendjét különböző technikákkal meghatározzuk. A mutációk azonosításához már ismerjük az eredeti bázissorrendet, amit a referenciagenom tartalmaz. Ezzel hasonlítjuk össze a mintánk DNS-eit.

A mutációk azonosítása azonban nem triviális feladat. A sok kis DNS-olvasatot, aminek már tudjuk a bázissorrendjét, különböző algoritmusokat használva a legjobban illeszkedő helyre tesszük a referenciában. Ez nagyjából annak felel meg, mint amikor egy mondat helyét szeretnénk megtalálni egy szövegben azzal a különbséggel, hogy itt betűk és írásjelek helyett négyféle (A,T,G,C jelű) bázis váltakozik, és a mutációk miatt a rövid mondatok (olvasatok) nem minidig egyeznek meg teljes mértékben a szöveg megfelelő mondatával. A felsokszorosítás és a több sejtet tartalmazó mintavétel miatt minden genomi pozíciót több ilyen olvasat fog lefedni. Ezek közül lesz olyan, ami meg fog egyezni a referenciával, mások viszont eltérést fognak mutatni. Az eltérések jelentik a lehetséges mutációkat. A mutáció lehet egy vagy több bázis kicserélődése, egy néhány bázis hosszúságú szakasz kitorlódése (deléciónja) vagy beékelődése (inzerciónja), illetve bonyolultabb, teljes kromoszómát érő elváltozás. A mutációk előfordulási gyakoriságának jellemzésére bevezethetjük a variáns allélfrekvenciát (VAF) mint a mutációt támogató olvasatok részarányát az adott genomi pozíción.

Ideális esetben, ha egy diploid (egy anyai és egy apai kromoszómakészletből álló) genomban megjelenik egy mutáció, az VAF = 0,5 értéket adna, hiszen egy mutáció általában csak az egyik kromoszómát (apai vagy anyai) érinti. A valóságban azonban ritkán beszélhetünk ideális esetről. Nagyon gyakran előfordul az, hogy rossz a referenciagenom, nem jó minőségűek az olvasatok. Az illesztés során is nagyon sok műtermék keletkezhet, például ha egy génszakasz több azonos vagy hasonló példányban is megtalálható a genomban.

Korábbi adatsor elemzése és néhány sejtvonala meghatározása

Nemrégiben megjelent egy tanulmány [3], amelyben a szerzők egy barackfa hét különböző ágáról gyűjtöttek mintákat (1. ábra, felső), és mindegyikből három szövetet – a termés héját, húsát és a közeli levelet – szekvenál-



1. ábra. Felső kép: a vizsgált fa fizikai szerkezete számozott ágakkal, a mintavételek helyével. Alsó kép: az említett mutációk alkotta sejtvonalak behelyezve a valós fába. A berajzolt sejtvonalak nem keresztezik egymást

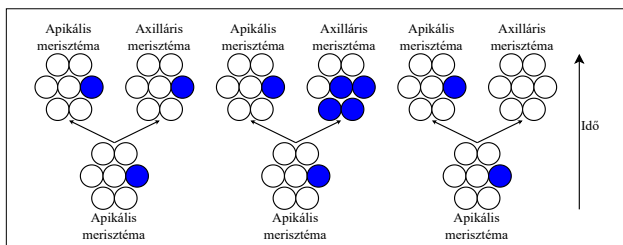
ták. Így összesen 21 minta teljes genomját vizsgálták, amelyek mind több sejtből álltak. Mi az eredeti adathalmazt újrafeldolgoztuk: az olvasatokat újraillesztettük a referenciagenomhoz, majd azonosítottuk és kiszűrtük az ismétlődő régiókat (amik a teljes genom mintegy 40%-át tették ki).

Az elemzés során több száz mutációt találtunk, amelyek különböző mintázatokat mutattak. Az első kategóriába azok a mutációk tartoztak, amelyek kizárólag egyetlen mintában fordultak elő – vagyis csak egy levélben, egy gyümölcshúsminatában, illetve egy gyümölcshéjminatában voltak kimutathatók. Ezek a mutációk nem érdekesek a számunkra, mert lehet, hogy a szövet kialakulása során a már differenciált sejtekben jöttek létre. A több mintában is előforduló mutációk viszont nagy valószínűséggel már az összejtekre jellemzők.

Azonosítottunk olyan mutációkat, amelyek csak egy adott ághoz tartoznak, de az adott ág mindhárom mintájában jelen vannak (és így feltehetőleg az L2 őssejtrétegből származnak). Ezek már hordozhatnak információt arról, hogy egy-egy szövetet hány őssejt és milyen arányban hoz létre.

De a legérdekesebbek azok a mutációk, amelyek több ágról vett mintában is megtalálhatóak, mert ezek feltehetőleg még azelőtt jelentek meg az őssejt-populációban, hogy az adott ágak elkülönültek volna egymástól. Ezeket már érdemes összevetni a barackfa fizikai szerkezetével.

Találtunk például két olyan mutációt, amelyik a 6-os és 7-es ág mindegyik mintájában jelen van, ami arra utal, hogy ezek még azelőtt keletkeztek, hogy a két ág elvált volna egymástól (1. ábra, alsó, piros sejtvonala). Ugyanakkor találtunk olyan eseteket is, ahol a mutációk nem követik a fa fizikai szerkezetét. Két mutáció (1. ábra, alsó, sárga sejtvonala) például minden ágban megtalálható volt, kivéve a 7-est, ahol egyik mintában sem jelent meg. Ez arra utal, hogy az a sejtvonala, amelyben a mutáció keletkezett, nem vett részt a 7-es ág kialakításában – vagyis a különböző ágak eltérő őssejt-populációkból származnak. Hasonló a helyzet másik két mutációval (1. ábra, alsó, lilás sejtvonala), amelyeket kizárólag a 2-es és 3-as ágban találtunk meg, de az 1-esben nem.



2. ábra. Különböző merisztémaosztódási típusok. Bal szélső ábra: minden őssejt osztódik az apikális merisztémában, ami azt eredményezi, hogy az új axilláris merisztéma összetétele meg fog egyezni az apikális merisztéma őssejtjeivel. Középső ábra: az apikális merisztéma őssejtjeiből csak néhány, például kettő a hétből vesz részt az új axilláris merisztéma képzésében. Ha az egyik kiválasztott sejt mutált, a mutáció magasabb allélfrekvenciával jelenik meg az új ágon. A jobb szélső ábrán az új axilláris merisztémát véletlenszerűen éppen olyan őssejt hozza létre, amelyek nem tartalmazzák a mutációt, ezért az új ágon a mutáció nem lesz kimutatható

Hogyan tudjuk megmagyarázni ezeket a mintázatokat? Naivan azt gondolhatnánk, hogy a csúcscrügyben található apikális merisztéma összes őssejtje részt vesz minden új rügy létrehozásában (2. ábra, bal szélső), de az adatok mást mutatnak. Az allélfrekvenciák elemzése szerint csak néhány, de nem az összes őssejt járul hozzá egy-egy rügy kialakulásához. Ennek magyarázata: ha például az apikális merisztéma 7 őssejtből áll, melyek közül egy mutált, akkor minden új szövetben a mutáció várható allélfrekvenciája $0,5/7 \approx 0,07$ lenne (azaz 150-szeres lefedettség mellett körülbelül 10 olvasatban jelenne meg). A mért allélfrekvenciák azonban ennél jóval magasabbak, ami arra utal, hogy a rügyképzéshez valójában csak az őssejt egy kis része járul hozzá. Tegyük fel például, hogy 7 őssejtből mindössze kettő vesz részt egy új ág kialakításában. Ekkor két eset lehetséges:

- ha a két őssejt közül az egyik hordozza a mutációt, akkor a várható allélfrekvencia $0,5/2 = 0,25$ (2. ábra, középső);
- ha egyikük sem mutált, akkor a mutáció nem jelenik meg az új ágon (2. ábra, jobb szélső).

Ez jól magyarázza, miért találunk sok mintában magas allélfrekvenciával egy adott mutációt, máshol pedig (akár a fa fizikai szerkezetével látszólag nem összeegyez-

tethető módon) miért tűnik el. Felmerülhetne, hogy a hiányzó mutációk oka a visszamutáció, azaz az eredeti bázissorrend visszaállása egy újabb mutáció hatására, ám ennek valószínűsége rendkívül kicsi, mi pedig elég gyakran találkozunk ilyen jelenséggel.

Hogyan tudjuk megadni azt a minimum őssejtszámot, ami kialakítja az új rügyet? Minden mutáció ugyanabban a 21 mintában lett azonosítva, ezért a mutációs mintázatoknak egyszerre kell teljesülniük. Ha például találunk egy mutációt, ami megjelenik a 2-es és 3-as ágban, de nem jelenik meg az 1-es ágban, ezzel párhuzamosan pedig találunk egy mutációt, ami megjelenik mindhárom ágban, az csak úgy lehet, ha több sejt-típus alakítja ki az ágakat. Ezzel a módszerrel az összes mutációt figyelembe véve megadhatjuk a minimum őssejtszámot, ami képzi a rügyeket. Eddigi tapasztalataink szerint ez a szám nagyon kicsi, minden őssejtrétegből csak néhány sejt járulhat hozzá az új rügyek képzéséhez.

A megfigyeléseinkből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a növények úgy csökkentik az őssejtosztódásaik számát, hogy rügyképzésnél nem a csúcscrügy összes őssejtje, hanem annak csak kis hányada osztódik és építi fel az új oldalrügyet. Ez biztosítja, hogy minden csúcscrügyben nagyon ritkán osztódnak az őssejtek, és így nagyon kis mértékben vannak kitéve a mutációk megjelenésének. Néhány gyors, egymást követő osztódáson csak akkor esnek át, amikor felépítik az új oldalrügy őssejt-populációját, de mihelyt csúcscrügygé válva új hajtást indít a rügy, már ismét nagyon ritkán fog egy-egy őssejt osztódni. Ez lehet a magyarázat arra is, hogy még több száz év alatt is miért osztódnak a tölgyfa ágcsúcsainak őssejtjei legfeljebb százszor.

Záró gondolatok

Fontos kiemelni, hogy minden módszer, amelyet használunk, szükségszerűen leegyszerűsíti a valóságban zajló biológiai folyamatokat. Számítások, modellezések és szimulációk során különböző közelítésekkel élünk: például feltételezzük, hogy az őssejt-populáció mérete állandó, és minden ágon azonos marad. Azt is adottnak vesszük, hogy az őssejtek osztódási mechanizmusa a fa teljes élettartama alatt változatlan, holott a természetben jól látható, hogy az idős fák kevesebb rügyet hoznak áganként, mint a fiatalabbak – ugyanakkor több ággal rendelkeznek, így összességében mégis több rügyet képezhetnek. Modelljeink nem veszik figyelembe a környezeti hatásokat sem, és minden mutációt neutrálisnak vesszünk. Ez a feltételezés nagyrészt helytálló, hiszen a legtöbb mutáció valóban semleges, nem jár közvetlen előnnyel vagy hátránnyal. Ugyanakkor megfigyeltek már olyan eseteket is, amikor egy fa bizonyos része ellenállóbb volt bizonyos kórokozókkal szemben, ami arra utal, hogy egyes mutációk szelektív előnyt is hordozhatnak.

Mindazonáltal ezek az egyszerűsített modellek rendkívül hasznosak: segítségükkel jobban megérthetjük a

komplex biológiai folyamatokat, és számszerűsíthetjük azokat a jelenségeket, amelyeket a kísérleti adatokkal is összevethetünk. Így tehát ez a megközelítés lehetővé teszi, hogy az őssejtek közvetlen megfigyelése nélkül megértsük, milyen folyamatok révén korlátozzák a fák az őssejtjeik osztódását, és ezzel együtt a mutációk felhalmozódását.

Irodalom

1. Schmid-Siegert E., et al. (2017): Low number of fixed somatic mutations in a long-lived oak tree. *Nature plants*, 3(12), 926–929.
2. Lanfear R. (2018): Do plants have a segregated germline? *PLoS Biology*, 16(5), e2005439.
3. Goel M., et al. (2024): The vast majority of somatic mutations in plants are layer-specific. *Genome Biology*, 25(1), 194.