

**A *BOTRYTIS CINEREA* EXTRACELLULÁRIS  
FEHÉRJEHÁLÓZATÁNAK VIZSGÁLATA  
TÖMEGSPEKTROMETRIAI, STATISZTIKAI ÉS  
HÁLÓZATELMÉLETI MÓDSZEREKKEL**

*Szám Dorottya<sup>1\*</sup> - Pogány Miklós<sup>2</sup> - Takács András<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*MATE, Növényvédelmi Intézet Növényvédelmi Tanszék*

<sup>2</sup>*ELKH, Agrártudományi Kutatóközpont, Növényvédelmi Intézet*

\*szam.dorottya.reka@gmail.com

**Összefoglalás**

Számos, egymástól igen távol eső biológiai struktúrában felfedezhetők a skálafüggetlen hálózatok. Ilyen hálózati modellel írható le a rákbetegség kialakulása, a COVID-19 járvány terjedése, néhány neurális hálózat felépítése, valamint több, már feltérképezett fehérje-fehérje interakciós hálózat. Kutatómunkánk során a botritizáció négy egymást követő fázisában lévő Furmint szőlőbogyókon laboratóriumban nevelt *B. cinerea* extracelluláris fehérjemintázatát hasonlítottuk össze a nemerothadásért (aszúsodásért) felelős metabolikus folyamatok mélyebb megértéséért. Eredményeink arra utaltak, hogy a *B. cinerea* extracelluláris fehérjehálózatára jó közelítést ad a Barabási-Albert féle skálafüggetlen hálózati modell. Vizsgálataink során meghatároztuk az extracelluláris fehérjehálózatok olyan főbb statikus paramétereit, mint a csomópontok és interakciós kapcsolatok száma, a fokszámeloszlás, az átlagos foksám és az

átlagos klaszterezettségi együttható. Továbbá azonosítottuk a hálózat főbb komponenseit, valamint a hálózat – és így a nemesrothadás – szempontjából kulcsfontosságú fehérjéket.

Kulcsszavak: Furmint, *Botrytis cinerea*, extracelluláris fehérjék, skálafüggetlen hálózatok

### Abstract

Scale-free networks can be discovered in many very distant biological structures. Such a scale-free model can describe the development of cancer, the spread of the COVID-19 epidemic, the structure of some neural networks, as well as several already mapped protein-protein interaction networks. In our research, we compared the extracellular protein pattern of laboratory-grown *B. cinerea* on Furmint grapes in four consecutive phases of botritization in order to gain a deeper understanding of the metabolic processes responsible for noble rot. Our results indicate that the extracellular protein network of *B. cinerea* can be well described by the Barabási-Albert scale-free network model. We characterized the main static parameters of extracellular protein networks, such as the number of nodes and interaction relationships, the degree distribution, the average number of degrees, and the average clustering coefficient. We identified the main components of the network and the fungal proteins that are important for the protein network, and thus responsible for noble rot.

Keywords: Furmint, *Botrytis cinerea*, extracellular proteins, scale-free networks

### Bevezetés

A XXI. században számos, egymástól igen távol eső biológiai és élettudományi struktúrában felfedezni vélték a skálafüggetlen hálózatokat. Egyre több tudományos eredmény arra utal, hogy bizonyos hálózatok skálafüggetlensége – túlzás nélkül – egyfajta természeti törvénynek

tekinthető (Buchanan, 2000). Ilyen hálózattal modellezhető a rákbetegség kialakulása (Andrew et al., 2020), a COVID-19 járvány terjedése (PARUL et ALBERT, 2020), valamint több, már feltérképezett ökológiai élelmiszer hálózat (Dunne, 2006), humán sejtműködési folyamat (Albert, 2005) és fehérje-fehérje kölcsönhatási rendszer (Giot, 2003; Ho et al., 2002). Kutatásunkban azt vizsgáltuk, hogy a botritizáció különböző fázisaiban lévő szőlőbogyókon nevelt *Botrytis cinerea* extracelluláris fehérjehálózata leírható-e skálafüggetlen hálózati modellel, és ha igen, akkor melyek e modell főbb paraméterei.

A *Botrytis cinerea* neve a görög botrus (βότρυς – szőlő) és a latin cinere (hamu) szavakból ered (Liddell, Scott, 1843), és a gomba konídiumai által okozott szürkés, hamuszerű elváltozásra utal. A *B. cinerea* a természetben nagyon ritkán előforduló aszkospóras *Botryotinia fuckeliana*nak az ivartalan (anamorf) alakja (Jackson, 2014). A *B. cinerea* polifág gomba, bizonyítottan 235 gazdanövényt – köztük a Furmint szőlőt képes megtámadni és rajtuk a szürkerothadás nevű betegséget kiváltani (Jarvis et al., 1977). A *B. cinerea* gomba fertőzése azonban az általunk is vizsgált Furmint fajta esetében nem csak káros, hanem jótékony is lehet. Ha a gomba a már teljesen érett szőlőbogyókat támadja meg, és egyidejűleg kedvező környezeti feltételek állnak fenn, elindul a nemesrothadás folyamata (Naár, Szarvas, 2012). Kutatásunk – sok más kérdés megválaszolása mellett – az ezen folyamatért felelős fehérjehálózat mélyebb megismerését tűzte ki célul.

A fehérje-fehérje kölcsönhatási hálózatok felfoghatók egymást kölcsönhatásba vivő vagy szabályozó elemek rendszereként, melyeket (irányítatlan) matematikai gráffal (Bollobás, 1979) ábrázolhatunk. A gráf itt egy olyan hálózatot jelent, amelyben a csúcsoknak a fehérjék, az éleknek pedig a fehérjék közötti kölcsönhatások feleltethetők meg. Egy hálózatot definíció (Barabási, 2016) szerint akkor tekinthetünk skálafüggetlennek, ha a hálózat – melynek matematikai megfelelője a gráf – fokszámeloszlása hatványfüggvénnyel írható le. Ha a  $k$  fokú csúcs előfordulási valószínűsége  $P(k)$ , akkor

$$P(k) \sim k^{-\gamma} \quad (1)$$

ahol  $\gamma$  a fokszámeloszlás hatványkitevője. A skálafüggetlen hálózat számos tulajdonsága függ a  $\gamma$  pontos értékétől. Számos skálafüggetlen hálózatban  $2 \leq \gamma \leq 3$ . Az élesztőgomba esetében  $\gamma=2,89$  fokszámkitevőt becsültek (Jeong et al., 2001), mely az egyetlen, gombák fehérjéire vonatkozó szakirodalmi adat.

A skálafüggetlen Barabási-Albert hálózatok olyan rendszereket írnak le, amelyek nem véletlenszerűen kapcsolódnak. Ezek a hálózatok ellenállóbbak a véletlen hibákkal szemben: a hálózat egy véletlenszerűen kiválasztott csomópontja (esetünkben fehérjéje) nagy valószínűséggel kevés kapcsolattal rendelkezik, így az eltávolítása nem vezet a teljes hálózat széteséséhez. Ugyanakkor a célzott támadásokkal szemben védtelenek ezek a rendszerek: a központi szerepű, legtöbb interakciós kapcsolattal rendelkező néhány fehérje eltávolítása a fehérjehálózat széteséséhez vezethet (Albert, 2000). Az ilyen – összetartásban kulcsfontosságú szerepet betöltő – fehérjéktől függhet az extracelluláris fehérjehálózat növekedése és fennmaradása (Albert, 2005; Barabási, 2016).

### Anyag és módszer

Tanulmányunk alapjául szolgáló kísérlet szőlőmintáit a Tokaj-hegyaljai borvidéken található Mád település határához közel eső Betsék-dűlőben gyűjtöttük. A talaj adottságai, valamint a mikroklíma itt különösen kedvező az aszúsodáshoz. A Furmint fajtájú szőlőültetvényből négyszer tíz mintagyűjtés történt morfológiai jegyek szerint az aszúsodás egymást követő fázisaiban lévő szőlőbogyókból. A mintákat – fázisonként elkülönítve – 50 ml-es centrifugacsövekbe gyűjtöttük, egy csőbe 10 bogyót, mind a négy aszúsodási fázisú bogyóból 10–10 centrifugacsövet töltöttünk meg. Az összegyűjtött bogyókat azonnal, az ültetvények helyszínén lefagyasztottuk folyékony nitrogénben, majd az Agrártudományi Kutatóközpont Növényvédelmi Intézetébe való szállítás során szárazjég pellettel töltött hungarocell dobozokba kerültek. Ezt követően a feldolgozásig

ultramélyhűtőben,  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os hőmérsékleten tároltuk. A *B. cinerea* extracelluláris fehérjemintázatát vizsgáló kísérlet során a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os fagyasztóból elővett szőlőbogyó mintákat 12 kDa MWCO (molekulatömeg-szűrési küszöbértékű) celofán liofilizáló membránba töltöttük és 10 cm hosszú zsákokat képeztünk (az átmérőjük 3 cm-es), visszahajtással és csíptetőkkal lezárva a végétüket. A *B. cinerea*-hoz így a bogyóból érkező kémiai és molekuláris szignálok eljuthattak, a szőlőből származó fehérjetöredékeket azonban kiszűrte a csomagolás. A bogyókat egészben helyeztük be a membránzsákokba. I–II. fázisú bogyókból 6 db-ot tettünk a zsákokba, III. fázisú bogyókból 7–8 db-ot, IV. fázisú bogyókból 11 db-ot. A *B. cinerea* spórákból 100000 ( $10^5$ ) ml szuszpenziót kentünk ecsettel a zsákokcsák felületére. A sporuláló tenyészetet (agarral szilárdított)  $\frac{1}{2}$ -es maláta táptalajon állítottuk elő, amit 5 napig sötétben, majd 5 napig folyamatos UV és fehér fény megvilágítás mellett neveltünk Petri-csészékben,  $21\text{ }^{\circ}\text{C}$  hőmérsékleten. A spórákat steril csapvízzel mostuk le a lemez felületéről. A zsákokcsákat műanyag dobozokba tettük egy rácsos felületre, és annyi vizet öntöttünk alá, hogy a rácsot ne lepje el. Szobahőmérsékleten (kb.  $21\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on) 8 napig nőttek. Addigra vastag penészbevonat jelent meg a zsákok felületén (két nap után már lehetett látni a szürkés bevonatot szabad szemmel). A zsákok két végét kinyitottuk és vízzel átmostuk. Visszazártuk a celofán két végét és 10 ml 50 mM Na-acetát pufferbe (pH=4,4) tettük. Petri-csészében szobahőmérsékleten óvatosan ráztattuk 2 órán át. A ráztatás végén nyert mosófolyadék mintákat centrifugáltuk (12000 g,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 12 perc), majd  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on lefagyasztottuk és fagyaszta liofilizáltuk. A folyamat végén 0,5 ml térfogatú extracelluláris fehérjekivonatot kaptunk. Az ép és aszúsodott szőlőbogyókon nevelt *B. cinerea* minták kontrolljaként Petri-csészében nevelt *Botrytis cinerea* extracelluláris mintázatát használtuk, amit *Aspergillus* minimál táptalajon tenyésztettünk és az extracelluláris fehérjefrakció kinyerése itt is az előbb bemutatott módszer szerint történt. Ezek a gomba minták nem kerültek kapcsolatba növényi eredetű kémiai szignálokkal. A fehérjék kvantitatív elemzésével az Agrártudományi Kutatóközpont a Természettudományi Kutatóközpontot bízta meg (Proteomikai labor, 1117. Budapest, Magyar Tudósok krt. 2.). Itt történt az enzimesztés, és az uHPLC-MS tömegspektrometriás mérés, a fehérjeazonosítás és jelöletlen kvantitálás.

### Eredmények értékelése

A tömegspektrométerrel összesen 447 fehérje azonosítása történt meg, melyek közül 404-et vontunk be a további vizsgálatokba. A tömegspektrométer alsó érzékenységi küszöbéhez közel eső bizonytalanul alacsony mért intenzitású fehérjéket, valamint a STRING hálózati adatbázisban nem szereplőket kiszűrtük. A fehérjehálózat modellezéséhez szükséges intenzitásadatokat a tömegspektrométeres vizsgálatból, a kölcsönhatási hálózatokat a STRING adatbázisból nyertük ki. JEONG et al. (2001) kutatásaikban többnyire szisztematikus kéthibrid elemzéssel kapták meg a vizsgált *S. cerevisiae* fehérje-fehérje közvetlen fizikai interakciós hálózatát. Mivel ilyen kísérlet esetünkben, *B. cinerea* fonalas gombával még nem történt, így egy új módszerre vállalkoztunk. A 404 különböző, STRING-azonosítóval jelzett fehérje döntő része megtalálható volt mindegyik mintában. Az interakciók hálózatát a szomszédsági gráf segítségével modelleztük Wolfram Mathematica 12.0 programmal. Közel azonos számú fehérjét találtunk a négy szőlőbogyót tartalmazó mintában, míg a kontrollmintában ennél valamivel többféle (387) extracelluláris fehérje fordult elő. A szőlőbogyót tartalmazó mintákban a kölcsönhatások száma alacsonyabb volt, míg a kontrollmintában több (1423). Az átlagos fokszám ( $\langle k \rangle$ ) az I. fázisú minta esetében volt a legalacsonyabb (6,88), míg a II. fázisú minta esetében a legmagasabb (7,16), a minták között azonban nem találtunk jelentősebb különbséget. Hasonló értékekről írnak más hálózati kutatások az *E. coli* fehérje-fehérje interakciós hálózata esetében  $\langle k \rangle = 7,4$  (WADE, 2007), illetve  $\langle k \rangle = 5,58$  (Barabási, 2016).

1. táblázat A különböző minták hálózati paramétereit

minta	N	L	$\langle k \rangle$	$\langle k^2 \rangle$	$k_{\max,1}$	$k_{\max,2}$	$k_{\max,3}$	N <sub>LPSG</sub>	N <sub>PSG</sub>	N <sub>IP</sub>	$\gamma$	ACC	$\langle d \rangle$
I.	354	1267	6,88	124,04	52	38	37	242	6	99	1,49	0,28	3,37
II.	358	1274	7,16	128,31	53	38	36	251	5	98	1,49	0,29	3,45
III.	354	1243	7,02	124,28	49	38	36	243	6	98	1,49	0,29	3,40
IV.	364	1264	6,95	122,68	51	38	37	249	5	106	1,52	0,29	3,40
kontroll	387	1423	6,95	138,82	54	43	38	257	7	114	1,12	0,28	3,34

csomópontok száma (N), élek száma (L), átlagos foksám ( $\langle k \rangle$ ), második momentum ( $\langle k^2 \rangle$ ), a három

legmagasabb foksámú csomópont foksáma ( $k_{\max,1}, k_{\max,2}, k_{\max,3}$ ), a legnagyobb valódi részgráf

csomópontjainak száma N<sub>LPSG</sub>, valódi részgráfok száma (N<sub>PSG</sub>), izolált pontok száma (N<sub>IP</sub>), foksámkitevő

( $\gamma$ ), átlagos klaszterezettségi együttható (ACC), átlagos úthossz ( $\langle d \rangle$ )

A fehérjék döntő része mindegyik mintában csupán néhány másik fehérjével állt kölcsönhatásban, míg kevés számú fehérje akadt, amely sok kapcsolattal rendelkező, központi szerepű volt. A legtöbb kölcsönhatási kapcsolattal a mindegyik mintában megtalálható M7U517 STRING azonosítójú celluláz fehérje rendelkezett, ami szőlőbogyón táplálkozó *B. cinerea* micéliumokban alacsonyabb szinten fejeződik ki, mint mesterséges táptalajon. A magas kapcsolattal rendelkező fehérjék között jelen volt még az M7U979 azonosítójú fehérje, ami a kitin anyagcserében szerepet játszó N-acetil-hexózáminidáz (nem változik lényeges mértékben a termelődése az általunk vizsgált mintákban). További kettő, sok kapcsolattal rendelkező fehérje az M7TF67 és az M7UBF7, melyek prediktált funkciója galaktóz-mutarotáz aktivitásra utal, ugyancsak kulcsszerepet töltenek be az extracelluláris hálózat összetartásában. További vizsgálatra érdemesek még a hálózat főkomponensétől távol eső fehérjék is, melyek sok kapcsolattal rendelkeznek. Érdemes lehet azt is megvizsgálni, hogy mi a szerepe az interakciós szempontból izolált fehérjéknek, melyek közül több kicsi, valódi részgráfot alkot.

Az aszúsodás mind a négy fázisában, valamint a táptalajon tenyésztett *B. cinerea* esetében is jó közelítést adott a Barabási-Albert modell az extracelluláris fehérjehálózat fokszámeloszlására. A  $\gamma$  értéke 1,12–1,52 közötti volt mind az 5 minta esetében, amely azonban eltér a kívánt  $2 \leq \gamma \leq 3$  értéktől. Barabási (2017) szerint a  $\gamma < 2$  esetben a skálafüggetlen hálózatok rendhagyó tulajdonságokat mutatnak, a modell alkalmazhatósága korlátokba ütközik.

### Irodalom

- Albert, R., Jeong, H. and Barabási, A-L. 2000. Error and attack tolerance of complex networks. *Nature*. **406**. 378–382.
- Albert, R. 2005. Scale-free networks in cell biology. *Journal of Cell Science* **118**(21). 4947–4957.
- Andrew, X. C. and Christopher, J. 2020. Scale-free structure of cancer networks and their vulnerability to hub-directed combination therapy. <https://doi.org/10.1101/2020.07.01.159657>
- Barabási, A-L. 2016. *Network Science*. Cambridge University Press.
- Bollobás, B. 1979. *Graph Theory: an Introductory Course*. New York, Springer Verlag
- Buchanan, M. 2000. *Ubiquity: The Science of History, or Why the World is Simpler Than We Think*. Weidenfeld & Nicolson.
- Dunne, J. A. 2006. The network structure of food webs. *In: Ecological Networks: Linking Structure to Dynamics in Food Webs*. 27–86.
- Giot, L., Bader, J. S., Brouwer, C., Chaudhuri, A., Kuang, B., Li, Y., Hao, Y. L., Ooi, C. E., Godwin, B., Vitols, E., Vijayadamar, G., Pochart, P., Machineni, H., Welsh, M., Kong, Y., Zerhusen, B., Malcolm, R., Varrone, Z., Collis, A., Minto, M., Burgess, S., McDaniel, L., Stimpson, E., Spriggs, F., Williams, J., Neurath, K., Ioime, N., Agee, M., Voss, E., Furtak, K., Renzulli, R., Aanensen, N., Carrola, S., Bickelhaupt, E., Lazovatsky, Y., DaSilva, A., Zhong,



- J., Stanyon, C. A., Finley, Jr. R. L., White, K. P., Braverman, M., Jarvie, T., Gold, S., Leach, M., Knight, J., Shimkets, R. A., McKenna, M. P., Chant, J. and Rothberg, J. M. 2003. A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science*. **302**. 1727–1736.
- Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G. D., Moore, L., Adams, S.-L., Millar, A., Taylor, P., Bennett, K., Boutilier, K., Yang, L., Wolting, C., Donaldson, I., Schandorff, S., Shewnarane, J., Vo, M., Taggart, J., Goudreault, M., Muskat, B., Alfarano, C., Dewar, D., Lin, Z., Michalickova, K., Willems, A. R., Sassi, H., Nielsen, P. A., Rasmussen, K. J., Andersen, J. R., Johansen, L. E., Hansen, L. H., Jespersen, H., Podtelejnikov, A., Nielsen, E., Crawford, J., Poulsen, V., Sørensen, B. D., Matthiesen, J., Hendrickson, R. C., Gleeson, F., Pawson, T., Moran, M. F., Durocher, D., Mann, M., Hogue, C. W. V., Figeys, D. and Tyers, M. 2002. Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature*. **415**. 180–183.
- Jackson, R. S. 2014. Botrytis. In: Robinson, R. K.; Batt, C. A.; Patel, P. D. (szerk.) Encyclopedia of Food Microbiology. Burlington Academic kiadó. 288–296.
- Jarvis, W. R. 1977. Botryotinia and Botrytis Species: Taxonomy, Physiology and Pathogenicity. Research Branch, Canada Department of Agriculture, Ottawa, Canada.
- Jeong, H. et al. 2001. Lethality and centrality in protein networks. *Nature*. **411**. 41–42.
- Liddell, H. G. and Scott, R. 1843. A Greek-English Lexicon. Oxford University Press.
- Naár Z. és Szarvas J. 2012. Borászati Mikrobiológia. Eszterházy Károly Főiskola Nyomda, Eger, 196.
- Parul, M. and Albert, R. 2020. Network model and analysis of the spread of Covid-19 with social distancing. *Applied Network Science*. **5**. 100.
- Wade, D. 2007. The Statistical Mechanics of Scale-free Networks.