doi 10.18699/bgrs2026-306

Механизмы внутриклеточного ответа на окислительный стресс у *Candida glabrata* с делецией фактора транскрипции RPN4 на уровне протеомного анализа

Кулагин К.А.[1], Богданова А.С.[1, 2, 3]*, Гладыш Н.С.[1, 2], Казакова Е.М.[2]
[1] *Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия*
[2] *ИНЭПХФ имени В. Л. Тальрозе ФИЦ ХФ РАН, Москва, Россия*
[3] *Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», Москва, Россия*
* *alina.bogdashka@yandex.ru*

Ключевые слова: *Candida glabrata*; RPN4; окислительный стресс; протеомика; протеасома; 4-NQO

Мотивация и цель: Candida glabrata является одним из наиболее значимых возбудителей кандидозов и характеризуется высокой устойчивостью к неблагоприятным воздействиям, включая окислительный стресс. Одним из перспективных регуляторов этой адаптации является фактор транскрипции Rpn4, известный как контроллер протеасомных генов и компонент сети клеточного стресс-ответа. Несмотря на данные о его вовлеченности в лекарственную устойчивость и регуляцию протеостаза, вклад Rpn4 в перестройку протеома *C. glabrata* при окислительном стрессе остается изученным недостаточно. Целью работы было охарактеризовать протеомные механизмы внутриклеточного ответа на окислительный стресс у *C. glabrata* при делеции RPN4.

Материалы и методы: в работе сравнивали штаммы *C. glabrata* WT (дикий штамм), Δpdr1, Δrpn4 и Δrpn4Δpdr1 в нормальных условиях и при действии 4-нитрохинолин-1-оксида (4-NQO) как индуктора окислительного стресса [1]. Для протеомного анализа использовали LC–MS1 на Orbitrap Q Exactive HF. Идентификацию белков проводили по базе UniProt для *C. glabrata* с применением ms1searchpy, количественный анализ – в DirectMS1Quant, функциональную активность и обогащение – с помощью QRePS в сочетании со STRING. Контроль качества протеомных данных показал стабильное число идентифицированных белков между повторами и хорошее покрытие протеома. Сравнения выполняли как между мутантами и WT, так и между стрессом и контролем внутри каждого штамма [2].

Результаты: Проведенный протеомный анализ показал, что внутриклеточный ответ *Candida glabrata* на 4-NQO сопровождается выраженной перестройкой белковых модулей, связанных с поддержанием протеостаза. Контроль качества протеомных данных продемонстрировал стабильное число идентифицированных белков между повторами и хорошее покрытие протеома, что позволило корректно сопоставлять WT, Δ*pdr1*, Δ*rpn4* и Δ*rpn4Δpdr1* как в контроле, так и в условиях окислительного стресса. Сравнение дифференциальных белков и последующий анализ обогащения показали, что наиболее существенные изменения при нарушении функции *RPN4* затрагивают не отдельные белки, а целые функциональные блоки, связанные с деградацией поврежденных белков и работой протеасомы.

Наиболее отчетливо этот сдвиг проявился у штамма Δ*rpn4* при воздействии 4-NQO. Для него были выявлены обогащения по таким процессам, как протеолиз, вовлеченный в катаболизм белков, убиквитин-зависимый катаболический процесс белков и сборка протеасомы. На уровне клеточных компонентов этим изменениям соответствовали категории, связанные с протеасомной системой, а среди аннотированных генов и белков встречались *RPN10*, *PUP2*, *SCL1*, *UFD1* и *CDC48*. Такой профиль указывает на то, что при делеции *RPN4* клетка в условиях окислительного стресса в значительной степени опирается на усиление протеасомно-зависимого катаболизма, то есть на удаление поврежденных или неправильно свернутых белков, накапливающихся при действии активных форм кислорода [3, 4]. Иными словами, в отсутствии нормальной регуляции со стороны Rpn4 адаптация смещается в сторону более напряженной работы систем внутриклеточного протеолиза.

Еще более выраженная перестройка наблюдалась у двойного мутанта Δrpn4Δpdr1 при действии 4-NQO. В этом случае, помимо убиквитин-зависимого катаболического процесса белков и протеолиза, вовлеченного в катаболизм белков, были обогащены такие категории, как протеасомный комплекс, регуляторная частица протеасомы, ядро протеасомы и сборка протеасомы. Дополнительно выявлялись процессы, связанные с метаболизмом и процессингом рРНК, а также такие клеточные компоненты, как прерибосома, комплекс РНК-полимеразы I и ядрышко. Это позволяет предположить, что при одновременном нарушении двух регуляторных факторов клетка отвечает на 4-NQO уже не только активацией деградации поврежденных белков, но и более глубокой перестройкой белоксинтетического аппарата и ядерных процессов. Такой ответ можно интерпретировать как признак более тяжелого стрессового состояния, при котором затрагиваются сразу несколько уровней клеточного гомеостаза.

Выводы: делеция RPN4 у *C. glabrata* при окислительном стрессе ассоциирована прежде всего с перестройкой протеасомных и протеолитических процессов, что указывает на ключевую роль Rpn4 в поддержании внутриклеточного протеостаза. Полученные данные позволяют рассматривать компоненты протеасомной

системы как перспективные молекулярные мишени для дальнейшего анализа механизмов стрессоустойчивости и потенциальных подходов к комбинированной противогрибковой терапии [5, 6].
Финансирование: Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 25-24-00956.

Proteome-level mechanisms of the intracellular response to oxidative stress in *Candida glabrata* with deletion of the RPN4 transcription factor

Kulagin K.A.[1], Bogdanova A.S.[1, 2, 3]*, Gladys N.S.[1, 2], Kazakova E.M.[2]
[1] *Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*
[2] *Talrose Institute for Energy Problems of Chemical Physics, Federal Research Center of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*
[3] *HSE University, Moscow, Russia*
* *alina.bogdashka@yandex.ru*

Key words: *Candida glabrata*; RPN4; oxidative stress; proteomics; proteasome; 4-NQO

Motivation and Aim: *Candida glabrata* is one of the most clinically significant causative agents of candidiasis and is characterized by high resistance to adverse conditions, including oxidative stress. One of the promising regulators of this adaptation is the transcription factor Rpn4, known as a regulator of proteasomal genes and a component of the cellular stress-response network. Despite evidence of its involvement in drug resistance and proteostasis regulation, the contribution of Rpn4 to proteome remodeling in *C. glabrata* under oxidative stress remains insufficiently understood. The aim of this study was to characterize the proteome-level mechanisms of the intracellular response to oxidative stress in *C. glabrata* upon *RPN4* deletion.
Materials and Methods: In this study, *C. glabrata* WT, Δ*pdr1*, Δ*rpn4*, and Δ*rpn4*Δ*pdr1* strains were compared under normal conditions and after treatment with 4-nitroquinoline-1-oxide (4-NQO) as an inducer of oxidative stress [1]. Proteomic analysis was performed using LC-MS1 on an Orbitrap Q Exactive HF instrument. Protein identification was carried out against the UniProt database for *C. glabrata* using ms1searchpy, quantitative analysis was performed in DirectMS1Quant, and functional activity and enrichment analysis were conducted using QRePS in combination with STRING. Quality control of the proteomic data showed a stable number of identified proteins between replicates and good proteome coverage. Comparisons were performed both between mutants and WT and between stress and control conditions within each strain [2].
Results: The proteomic analysis showed that the intracellular response of *Candida glabrata* to 4-NQO is accompanied by pronounced remodeling of protein modules associated with proteostasis maintenance. Quality control of the proteomic data demonstrated a stable number of identified proteins across replicates and good proteome coverage, which allowed reliable comparison of WT, Δ*pdr1*, Δ*rpn4*, and Δ*rpn4*Δ*pdr1* under both control and oxidative stress conditions. Comparison of differentially expressed proteins followed by enrichment analysis showed that the most substantial changes associated with impaired *RPN4* function affect not individual proteins, but entire functional modules related to degradation of damaged proteins and proteasome activity.
This shift was most clearly observed in the Δ*rpn4* strain under 4-NQO treatment. Enrichment was detected for such processes as proteolysis involved in protein catabolic process, ubiquitin-dependent protein catabolic process, and proteasome assembly. At the level of cellular components, these changes corresponded to categories associated with the proteasome system, and the annotated genes and proteins included *RPN10*, *PUP2*, *SCL1*, *UFD1*, and *CDC48*. This profile indicates that, under oxidative stress conditions, *RPN4* deletion causes the cell to rely to a considerable extent on enhanced proteasome-dependent catabolism, that is, on the removal of damaged or misfolded proteins accumulating under reactive oxygen species exposure [3, 4]. In other words, in the absence of normal Rpn4-mediated regulation, adaptation shifts toward a more intense activity of intracellular proteolytic systems.
An even more pronounced remodeling was observed in the double mutant Δ*rpn4*Δ*pdr1* under 4-NQO treatment. In this case, in addition to ubiquitin-dependent protein catabolic process and proteolysis involved in protein catabolic process, such categories as proteasome complex, proteasome regulatory particle, proteasome core complex, and proteasome assembly were enriched. In addition, processes associated with rRNA metabolism and rRNA processing were detected, as well as such cellular components as preribosome, RNA polymerase I complex, and nucleolus. This suggests that simultaneous disruption of the two regulatory factors causes the cell to respond to 4-NQO not only by activating degradation of damaged proteins, but also by a deeper remodeling of the protein synthesis machinery and nuclear processes. Such a response can be interpreted as a sign of a more severe stress state affecting several levels of cellular homeostasis at once.
Conclusions: Deletion of *RPN4* in *C. glabrata* under oxidative stress is primarily associated with remodeling of proteasomal and proteolytic processes, indicating a key role of Rpn4 in maintaining intracellular proteostasis. The obtained data suggest that components of the proteasome system may be considered promising molecular targets for further analysis of stress-resistance mechanisms and for the development of potential combinatorial antifungal strategies [5,6].
Funding: This work was supported by the Russian Science Foundation, grant No. 25-24-00956.

Список литературы/References

1. Pais P., Califórnia R., Galocha M., Viana R., Cavalheiro M., Pereira D., Teixeira M.C. Candida glabrata transcription factor Rpn4 mediates fluconazole resistance through regulation of ergosterol biosynthesis and plasma membrane permeability. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2020;64(9):e00554-20. doi:10.1128/AAC.00554-20.
2. Cuéllar-Cruz M., Briones-Martin-del-Campo M., Cañas-Villamar I., Montalvo-Arredondo J., Riego-Ruiz L., Castaño I., De Las Peñas A. High resistance to oxidative stress in the fungal pathogen Candida glabrata is mediated by a single catalase, Cta1p, and is controlled by the transcription factors Yap1p, Skn7p, Msn2p, and Msn4p. *Eukaryotic Cell*. 2008;7(5):814-825. doi:10.1128/EC.00011-08.
3. Saijo T., Miyazaki T., Izumikawa K., et al. Skn7p is involved in oxidative stress response and virulence of Candida glabrata. *Mycopathologia*. 2010;169(2):81-90. doi:10.1007/s11046-009-9233-5.
4. Merhej J., Frigo A., Le Crom S., Camadro J.M., Devaux F. A network of paralogous stress response transcription factors in the human pathogen Candida glabrata. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7:645. doi:10.3389/fmicb.2016.00645.
5. Karpov D.S., Spasskaya D.S., Tutyaeva V.V., Mironov A.A., Gelfand M.S., Kulichkov V.A. Deregulation of the 19S proteasome complex increases yeast resistance to 4-NQO and oxidative stress via upregulation of Rpn4- and proteasome-dependent stress responsive genes. *FEMS Yeast Research*. 2019;19(2):foz002. doi:10.1093/femsyr/foz002.
6. Owsianik G., Balzi L., Ghislain M. Control of 26S proteasome expression by transcription factors regulating multidrug resistance in Saccharomyces cerevisiae. *Molecular Microbiology*. 2002;43(5):1295-1308. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.02823.x.