

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ



УДК 577.217

Структурное исследование рибосомы *Candida auris*

А.А. Атамас*, А.И. Гуськов, А.В. Рогачев

¹Центр исследований молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний,
Московский физико-технический университет,
Россия, Московская область, 141701, г. Долгопрудный, Институтский пер., 9
*e-mail: atamas.aa@phystech.edu

Candida auris — патогенный грибок, вызывающий инфекции у людей с ослабленной иммунной системой. Он устойчив к антимикробным препаратам, что усложняет лечение. *C. auris* представляет серьезную угрозу для здоровья населения, так как имеет высокую резистентность и контагиозность. Поскольку рибосома играет ключевую роль в жизнедеятельности организмов, поиск ингибиторов рибосомы *C. auris* имеет большое практическое значение. Мы использовали криоэлектронную микроскопию и анализ отдельных частиц для получения трехмерной структуры рибосомы *C. auris*. Мы описываем особенности рибосомальной РНК *C. auris*, что предоставляет ценную информацию для разработки лекарственных средств для борьбы с данным патогеном.

Ключевые слова: *Candida auris*, рибосома, инфекции, резистентность, криоэлектронная микроскопия, структурная биология

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-3S-8

Введение

Candida auris является патогенным грибом, способным вызывать инфекции у людей, особенно у пациентов с ослабленной иммунной системой. Одной из особенностей *C. auris* является его устойчивость к широкому спектру антимикробных препаратов, что влечет за собой сложности в лечении инфекций, обусловленных данным патогеном. В связи с его резистентностью и высокой контагиозностью, *C. auris* представляет серьезную угрозу для здоровья населения [1]. Рибосома, как одна из ключевых молекулярных мишеней, критически необходима для выживания и развития этой инфекции. В связи с этим поиск видоспецифичных низкомолекулярных ингибиторов рибосомы *C. auris* является клинически-значимой задачей. Для определения уникальных сайтов связывания ингибиторов рибосомы необходима трехмерная атомарная модель.

Используя криоэлектронную микроскопию и метод анализа отдельных частиц мы впервые получили трехмерную структуру рибосомы *C. auris* с разрешением 2,8 Å. Детальный анализ структуры с использованием UCSF Chimera позволил обнаружить ранее неизвестные конформационные изменения в рибосоме *C. auris*, которые могут быть связаны с механизмами резистентности к антибиотикам. Мы описываем архитектуру рибосомальной РНК, а также ее интересные особенности. Эти находки предоставляют ценную информацию

для разработки более эффективных стратегий борьбы с *C. auris* и улучшения прогноза заболеваний, связанных с этим патогеном.

Наше исследование подчеркивает важность электронной микроскопии в изучении структурных и функциональных характеристик рибосомы *C. auris*. Полученные результаты способствуют дальнейшему пониманию этого патогена и могут быть использованы в разработке новых стратегий лечения инфекций, вызванных *C. auris*.

Материалы и методы

Очистка рибосом. 80S-рибосомы *C. auris* очищали, следуя ранее опубликованному протоколу [2]. Клетки растили в колбах в среде дрожжевой экстракт-пептон-декстроза (yeast extract peptone dextrose, YPD) при 30°C. Клетки осаждали центрифугированием, ресуспендировали с YPD и инкубировали в колбах при интенсивном встряхивании (250 об./мин) в течение 10 мин. Клетки осаждали и трижды промывали в буфере М (30 мМ HEPES-КОН (pH 7,5), 50 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 8,5% маннит, 2 мМ дитиотреитола (ДТТ) и 0,5 мМ ЭДТА). Суспензию клеток механически разрушали стеклянными шариками (Sigma-Aldrich, США) на вортексе с частотой 40 Гц в течение 1 мин с 1-минутными перерывами на льду между каждым встряхиванием. Стеклянные шарики удаляли быстрым центрифугированием (20 000 г в течение 2 мин), а лизат

дополнительно очищали более длительным центрифугированием (30 000 g в течение 9 мин). Затем добавляли полиэтиленгликоль (ПЭГ) 20000 (Hampton Research, США) до конечной концентрации 4,5% (масса/объем), и раствор оставляли стоять на льду в течение 5 мин. Раствор осветляли центрифугированием (20 000 g, 5 мин). Затем концентрацию ПЭГ 20000 доводили до 8,5% и раствор оставляли на 10 мин на льду. Рибосомы осаждали (17 500 g в течение 10 мин) затем суспендировали в буфере М+ (буфер М, содержащий KCl в концентрации 150 mM, с добавлением ингибиторов протеаз и гепарина).

Далее рибосомы очищали в градиенте сахарозы от 10 до 30%, а после отбирали соответствующие фракции и добавляли ПЭГ 20000 до конечной концентрации 7% (масса/объем). Рибосомы осаждали (17 500 g в течение 10 мин.) и суспендировали в буфере G (10 mM Hepes-KOH (pH 7,5), 50 mM KOAc, 10 mM NH₄OAc, 2 mM DTT и 5 mM Mg(OAc)₂).

Криоэлектронная микроскопия: замораживание сеток и обработка изображений. Образец очищенной рибосомы с концентрацией ~1 мг/мл по 2,7 мкл наносили на углеродные сетки (Quantifoil Cu R1.2/1.3 с ультратонкой углеродной подложкой, 200 меш; Quantifoil, Германия), избыток жидкости удаляли в течение 3–5 с помощью FEI Vitrobot Mark IV (Thermo Fisher Scientific, США), и замораживали погружением в жидкий этан. Подготовленные сетки переносили в микроскоп Talos Arctica 200 кэВ (Thermo Fisher Scientific, США), оснащенный детектором прямых электронов K2. Изображения с нулевыми потерями записывались полуавтоматически с использованием скрипта UCSF Image. Квантовый энергетический фильтр GIF был настроен на ширину щели 20 эВ. Изображения были получены при различном номинальном увеличении с размером пикселя от

0,413 до 1,012 Å и с диапазоном дефокуса от -0,5 до -3,0 мкм. Видеоизображения были собраны с 24 кадрами, фракционированными по дозе в течение 18 с.

Обработка данных. После выполнения процедур коррекции подвижек и оценки функции переноса контраста в программном комплексе CryoSPARC [3], была произведена отбраковка микрографов по значениям функции переноса контраста и общей величины подвижек. Выборка частиц наилучшего качества производилась путем генерации двумерных классов. Дальнейшая отфильтровка производилась путем генерации трехмерной реконструкции с разделением на два пространственных объекта. Финальная реконструкция была произведена по протоколу Non-uniform refinement в программном комплексе CryoSPARC с финальным разрешением 2,8 Å.

Моделирование. Структура рибосомы 80S *Candida albicans* использовалась в качестве шаблона для построения модели. Сопоставление модели с картой было выполнено в Chimera [4]. Субъединицы 60S и 40S были уточнены отдельно в их соответствующих сфокусированных картах с использованием уточнения Phenix [5] в прямом пространстве. Цепи белков и рРНК визуально проверяли в Coot и при необходимости корректировали вручную.

Результаты и обсуждение

При создании модели рибосомы *C. auris* использовалась ранее полученная модель *C. albicans* (7PZY), что позволило выявить ряд интересных особенностей полученной структуры рибосомы. Биоинформатический анализ рибосомальных белков *C. albicans* и *C. auris* показал, что они не имеют значительных отличий и обладают высокой гомологией. Однако, несмотря на ожидаемую высокую консервативность рибосомальной РНК в пределах

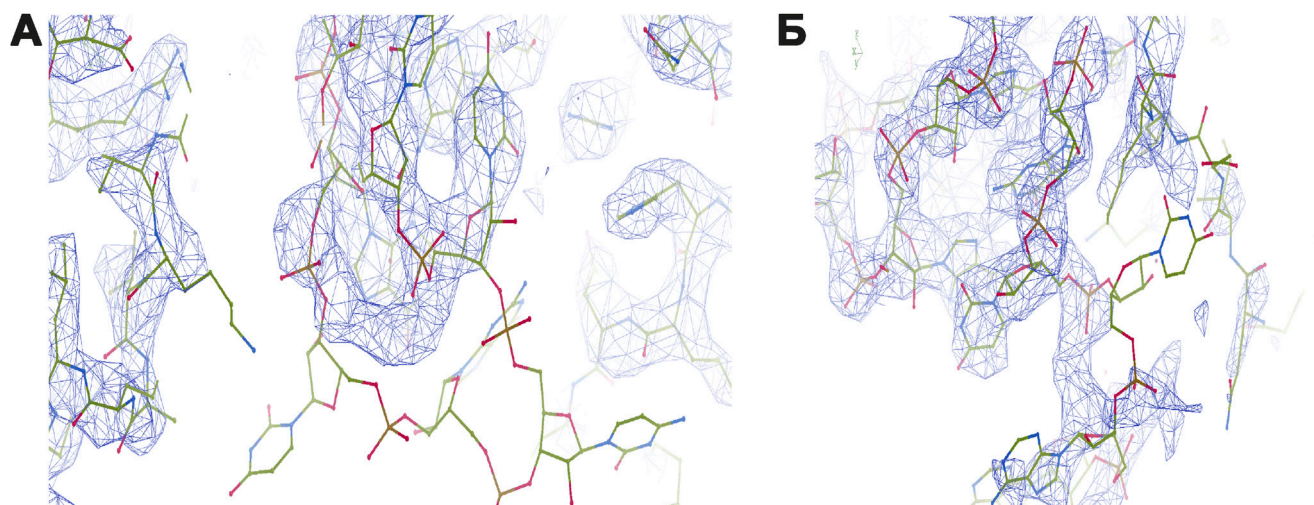


Рисунок. Сравнение 25S рРНК *Candida albicans* с картой плотности для рРНК *Candida auris*. А — отсутствие плотности для некоторых нуклеотидов, указывающая на делецию в цепи рРНК *C. auris*; Б — плотность, несоответствующая геометрии цепи РНК, указывающая на изменение конфигурации цепи рРНК *C. auris*.

одного вида, сравнение рРНК *C. albicans* с картой плотности для рРНК *C. auris* выявило наличие некоторых отличающихся участков.

Значительных отличий у 5.8S и 5S рРНК у *C. albicans* и *C. auris* не выявлено, но 25S рРНК у *C. auris* имеет некоторые особенности (рисунок). Наблюдается отсутствие плотности для некоторых нуклеотидов (рисунок, А), из чего можно предположить, что последовательность рРНК *C. auris* короче таковой у *C. albicans*. Так же было выявлено изменение геометрии некоторых участков (рисунок, Б), что может влиять на взаимодействие рРНК с рибосомальными белками или химическими соединениями, играющими роль ингибиторов рибосомы.

На данный момент рибосомальная РНК *C. auris* не была полностью расшифрована, что ограничивает наши возможности сделать окончательные выводы о характеристиках и влиянии найденных особенностей рРНК на резистентность этого патогена. Изучение и расшифровка рибосомальной РНК *C. auris* может предоставить более глубокое понимание ее структурных и функциональных особенностей, а также позволить прояснить причины устойчивости этого патогена к противогрибковым препаратам.

Дальнейшие исследования рибосом *C. auris*, включая полное расшифрование его рибосомной

РНК, анализ его белковых компонентов и сравнение с рибосомами других видов *Candida*, могут пролить свет на механизмы устойчивости *C. auris* и помочь разработать эффективные стратегии борьбы с этим патогеном.

Заключение

Исследование структуры рибосомы *C. auris* с использованием криоэлектронной микроскопии и анализа отдельных частиц позволило обнаружить конформационные изменения, которые возможно связаны с резистентностью к антибиотикам. Описание архитектуры рибосомы и ее субъединиц предоставляет ценную информацию для борьбы с *C. auris* и улучшения прогноза заболеваний, вызванных этим патогеном. Полученные результаты подчеркивают важность электронной микроскопии для изучения аппарата трансляции этого патогена и могут привести к разработке новых стратегий лечения и предотвращения инфекций, вызванных *C. auris*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 20-64-47041). Исследования проведены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lockhart S.R., Etienne K.A., Vallabhaneni S., et al. Simultaneous emergence of multidrug-resistant *Candida auris* on 3 continents confirmed by whole-genome sequencing and epidemiological analyses. *Clin Infect Dis*. 2017;64(2):134–140.
2. Zgadzay Y., Kolosova O., Stetsenko A., Wu C., Bruchlen D., Usachev K., Validov S., Jenner L., Rogachev A., Yusupova G., Sachs M.S., Guskov A., Yusupov M. E-site drug specificity of the human pathogen *Candida albicans* ribosome. *Sci. Adv*. 2022;8(21):eabn1062.
3. Punjani A., Rubinstein J., Fleet D., Brubaker M. CryoSPARC: algorithms for rapid unsupervised cryo-EM structure determination. *Nat. Methods* 2017;14(3):290–296.
4. Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem*. 2004;25(13):1605–1612.
5. Liebschner D., Afonine P.V., Baker M.L., et al. Macromolecular structure determination using X-rays, neutrons and electrons: recent developments in Phenix. *Acta Crystallogr. D: Struct. Biol*. 2019;75(10):861–877.

Поступила в редакцию 29.05.2023

После доработки 16.08.2023

Принята в печать 17.08.2023

SHORT COMMUNICATION

Structural study of the *Candida auris* ribosome

A.A. Atamas* , A.I. Guskov, A.V. Rogachev

¹Center for Research on Molecular Mechanisms of Aging and Age-Related Diseases, Moscow University of Physics and Technology, 9 Institutskiy per., Dolgoprudny, 141701, Moscow region, Russia

*e-mail: atamas.aa@phystech.edu

Candida auris is a pathogenic fungus that causes infections in people with weakened immune systems. It is resistant to antimicrobial drugs, which complicates treatment. *C. auris* poses a serious threat to public health, as it has a high resistance and contagiousness. The ribosome plays an important role in the survival and development of this infection, and the search for inhibitors

of the *C. auris* ribosome is of great importance. We used cryoelectron microscopy and single particle analysis to obtain the three-dimensional structure of the *C. auris* ribosome. We describe the architecture of the ribosome subunits and their interactions, providing valuable information for the development of novel anti-fungals against *C. auris*.

Keywords: *Candida auris*, ribosome, infections, resistance, cryo-electron microscopy, structural biology

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation, project number 20-64-47041.

Сведения об авторах

Атамас Анастасия Алексеевна — аспирантка, мл. науч. сотр. Центра исследований молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний. Тел.: 8-495-408-45-54; e-mail: atamas.aa@phystech.edu; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7884-7653>

Гуськов Альберт Игоревич — канд. физ.-мат. наук, вед. науч. сотр., зав. лабораторией структурной электронной микроскопии биологических систем. Тел.: 8-495-408-45-54; e-mail: a.guskov@rug.nl

Рогачев Андрей Вячеславович — канд. физ.-мат. наук, вед. науч. сотр., зам. директора центра молекулярных механизмов старения. Тел.: 8-495-408-45-54; e-mail: rogachev.av@phystech.edu