

УДК 577.21

## МЕТИЛИРОВАНИЕ рРНК И УСТОЙЧИВОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ

### Обзор

© 2020 И.А. Остерман<sup>1,2</sup>, О.А. Донцова<sup>1,2,3</sup>, П.В. Сергиев<sup>1,2,4\*</sup>

<sup>1</sup> Сколковский институт науки и технологии, Центр наук о жизни, 143028 Сколково, Россия; электронная почта: petya@genebee.msu.ru

<sup>2</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991 Москва, Россия

<sup>3</sup> Институт биоорганической химии имени акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, Россия

<sup>4</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Институт функциональной геномики, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 12.06.2020

После доработки 16.07.2020

Принята к публикации 16.07.2020

Метилирование нуклеотидных остатков рРНК – один из основных механизмов устойчивости бактерий к действию ингибиторов синтеза белка. Гены необходимых для этого метилтрансфераз встречаются и у штаммов-продуцентов, и у клинических изолятов патогенных бактерий. В ряде случаев, напротив, метилирование рРНК ферментами «домашнего хозяйства» оказывается необходимым для активности антибиотиков. Известно как о кооперативности, так и о взаимоисключающем характере модификаций рРНК, так или иначе связанных с эффективностью антибиотиков. Интересно понимание эволюционных взаимоотношений систем модификации рРНК ферментами «домашнего хозяйства» и метилтрансфераз антибиотикорезистентности. Обсуждению всего этого спектра вопросов посвящен данный обзор.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** рибосома, метилирование, антибиотики, трансляция, макролиды, аминогликозиды.

**DOI:** 10.31857/S0320972520110056

### ВВЕДЕНИЕ

Один из основных механизмов действия антибиотиков – нарушение синтеза белка за счет связывания в функциональных центрах рибосомы – пептидилтрансферазном (ПТЦ) и декодирующем (ДЦ) центрах и пептидном туннеле (ПТ) [1]. В этих же центрах располагается большая часть модифицированных нуклеотидных остатков рибосомной РНК (рРНК) [2]. Известно, что метилирование участков связывания – это один из основных механизмов устойчивости к антибиотикам, действующим на рибосому. Подобное метилирование распространено как среди продуцентов этих антибактериальных агентов, так и среди патогенных бактерий, вызывающих инфекционные заболевания человека и животных. В то же время известно множество модифицированных нуклеотидных остат-

ков рРНК, распространенных среди более широких групп бактерий и даже повсеместно, чье присутствие, на первый взгляд, не связано с антибиотиками. Однако среди подобного рода консервативно модифицированных, как правило, метилированных нуклеотидных остатков, встречаются те, что обеспечивают как умеренный уровень устойчивости, так и, наоборот, определяют чувствительность к антибиотикам, влияют на приспособленность к устойчивости (так называемые *fitness cost*) и служат эволюционным резервуаром для возникновения генов устойчивости. Данный обзор посвящен разным аспектам влияния метилирования рРНК на устойчивость к антибиотикам.

### МЕТИЛИРОВАНИЕ НУКЛЕОТИДНЫХ ОСТАТКОВ 23S рРНК, НАХОДЯЩИХСЯ В ПЕПТИДНОМ ТУННЕЛЕ

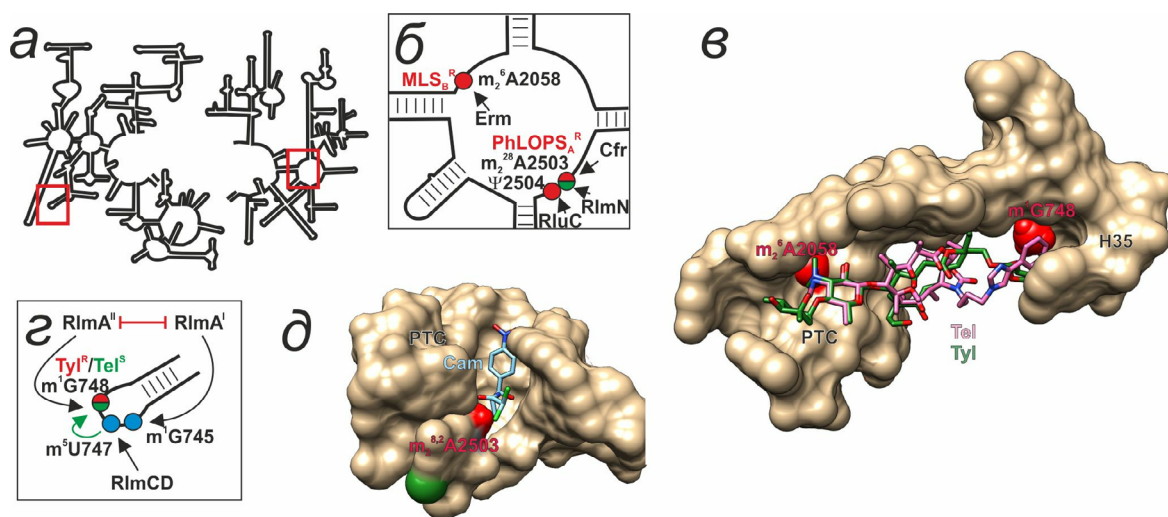
Пептидный туннель, через который проходят синтезируемые рибосомой белки, пронизывает большую субчастицу рибосомы от ПТЦ до про-

Принятые сокращения: ДЦ – декодирующий центр; ПТЦ – пептидилтрансферазный центр; ПТ – пептидный туннель; рРНК – рибосомная РНК.

\* Адресат для корреспонденции.

типоволожной, так называемой цитоплазматической, стороны. С туннелем взаимодействуют как регуляторные пептидные последовательности, так и несколько классов антибиотиков [3]. Самым известным, а также наиболее значимым с точки зрения практической медицины случаем, когда метилирование вызывает устойчивость к антибиотикам, является диметилирование расположенного в ПТ нуклеотидного остатка A2058 23S рРНК (здесь и далее нумерация нуклеотидных остатков рРНК *Escherichia coli* по N6 атому метилтрансферазами семейства Erm [4] (рис. 1, а–в; таблица). Эта модификация вызывает устойчивость к большой группе антибиотиков – макролидам, линкозамидам и стрептограмминам В класса [4, 5]. Нуклеотидный остаток A2058 23S

рРНК располагается в ПТ на небольшом расстоянии от ПТЦ и контактирует с антибиотиками этих трех классов. Диметилирование (а в случае линкозамидов – монометилирование) при помощи TlrD и нескольких родственных ферментов [5] нарушает связывание антибиотиков за счет неспособности образовывать водородную связь с A2058 и перекрывания с метильной группой (рис. 1, в). Этот механизм устойчивости широко распространен среди продуцентов макролидов и патогенных штаммов, для борьбы с которыми используются эти антибиотики [6]. Предполагается, что источником распространения генов семейства *erm* среди бактерий, в том числе патогенных, был горизонтальный перенос генов от штаммов-продуцентов [7]. В то же время остав-



**Рис. 1.** Влияние модифицированных нуклеотидных остатков пептидного туннеля и ПТЦ на взаимодействие с антибиотиками. *а* – Схема вторичной структуры 23S рРНК. Красными прямоугольниками обозначены области, рассмотрению которых посвящены другие панели рисунка. *б* – Вторичная структура участка V домена 23S рРНК, образующего часть ПТЦ и ПТ. Модифицированные нуклеотидные остатки, обсуждаемые в тексте, обозначены цветными кружками и подписаны. Красным выделены модификации устойчивости к антибиотикам (MLS<sub>B</sub><sup>R</sup> – устойчивость к макролидам, линкозамидам и стрептограмминам В; PhLOPS<sub>A</sub><sup>R</sup> – устойчивость к фениколам, линкозамидам, оксазалидинонам, плевомутилинам и стрептограмминам А), зеленым – модификация, способствующая связыванию антибиотиков. Стрелками показана активность модифицирующих ферментов (подписаны), направленная на соответствующие нуклеотидные остатки. *в* – Пространственная структура участка рибосомы, образующего ПТ (показана в виде молекулярной поверхности) и связанных с рибосомой антибиотиков тилозина (показан зеленой проволочной моделью и подписан) и телитромицина (показан розовой проволочной моделью и подписан). Красными Ван-дер-Ваальсовыми сферами показаны метильные группы нуклеотидных остатков m<sup>1</sup>G748 и m<sup>2</sup>A2058 23S рРНК, перекрывающиеся с участком связывания тилозина и, в случае m<sup>2</sup>A2058, телитромицина. Подписаны некоторые элементы вторичной структуры 23S рРНК. *г* – Вторичная структура спирали 35 23S рРНК, образующей часть ПТ. Модифицированные нуклеотидные остатки, обсуждаемые в тексте, обозначены цветными кружками и подписаны. Красным и зеленым выделена и подписана модификация, определяющая повышенную устойчивость к тилозину и чувствительность к телитромицину. Синими кружками показаны модификации ферментами «домашнего хозяйства». Черными стрелками показана активность модифицирующих ферментов (подписаны), направленная на соответствующие нуклеотидные остатки. Зеленая стрелка обозначает стимулирующее влияние одной модификации на другую, а красная линия, заканчивающаяся чертой – взаимоисключающие модификации. *д* – Пространственная структура участка рибосомы, образующего ПТЦ (обозначен РТЦ) и связанный с рибосомой антибиотик хлорамфеникол (показан голубой проволочной моделью и подписан). Красными и зелеными Ван-дер-Ваальсовыми сферами показаны метильные группы, присоединенные к С2 и С8 атомам нуклеотидного остатка m<sup>8,2</sup>A2503 23S рРНК, препятствующие и способствующие связыванию хлорамфеникола и ряда других антибиотиков соответственно. При создании рисунка, включая наложение пространственных структур друг на друга и моделирование модифицированных нуклеотидных остатков, использовалась программа UCSF Chimera [10]. В создании рисунка использовались вторичные структуры рРНК [11], а также пространственные структуры 1K9M [12], 4V7Z [13], 6ND5 [14]. (С цветными вариантами рис. 1–4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)

ся открытым вопросом о происхождении предковых генов *erm* в самих штаммах-продуцентах. Поиск аминокислотных последовательностей, подобных белкам Erm, среди бактерий [8] однозначно приводит к идентификации универсально консервативной 16S рРНК метилтрансферазы RsmA(KsgA), как наиболее эволюционно близкой. Более того, специфичность RsmA(KsgA) может быть изменена на способность модифицировать субстрат Erm всего лишь с помощью замены двух петель [9]. Можно предположить, что  $m_2^6A1518/19$  16S рРНК метилтрансфераза, также осуществляющая диметилирование остатков аденозина по экзоциклическому N6 атому, была предковым ферментом для эволюции устойчивости метилтрансфераз семейства Erm.

Почему же, в отличие от RsmA(KsgA), гены Erm-метилтрансфераз не распространились среди других таксономических групп организмов? По-видимому, дело во вредном влиянии модификации  $m_2^6A2058$  23S рРНК на приспособленность клеток бактерий в отсутствие антибиотиков. Негативный эффект от метилирования, судя по всему, связан не с повышенными затратами на синтез метилтрансферазы, а с тем, что модифицированные рибосомы синтезируют белки в неоптимальных пропорциях за счет взаимодействия модифицированного A2058 с аминокислотными остатками растущего белка внутри ПТ [15]. Клетки, имеющие постоянно активную метилтрансферазу ErmC и соответственно диметилированный A2058, проигрывают конкуренцию тем, у которых модификации нет [15]. Именно этим, по-видимому, объясняется подавление экспрессии генов *erm* в отсутствие макролидов не только у большинства устойчивых штаммов, но даже у штамма-продуцента [16]. Наиболее распространенный механизм регуляции экспрессии генов *erm* связан с торможением рибосомы на короткой рамке считывания, расположенной перед геном метилтрансферазы [17–19], из-за чего инициаторный участок гена устойчивости становится доступным для связывания с другой рибосомой. Альтернативными регуляторными механизмами, позволяющими активировать гены семейства *erm* в присутствии антибиотиков, являются аттенуация транскрипции [20], использование специфичного транскрипционного фактора [21] или индуцируемый кетолидами сдвиг рамки считывания [22].

Метилирование нуклеотидного остатка G748 23S рРНК, также расположенного в туннеле большой субчастицы рибосомы (рис. 1, а, в и г) по N1 атому, в комбинации с монометилированием A2058 обеспечивает устойчивость бактерии-продуцента к 16-членному макролиду с объемными сахарными заместителями – тилозину

[23], при этом модификации A2058 или G748 по отдельности недостаточно для обеспечения устойчивости. Формирование  $m^1G748$  23S рРНК осуществляет метилтрансфераза RlmA<sup>I</sup> (TlrD), которая встречается у многих грамположительных бактерий, у грамотрицательных обычно присутствует ее гомолог RlmA<sup>I</sup>, модифицирующий расположенный рядом нуклеотидный остаток G745 23S рРНК по N1 положению [24] (рис. 1, з; таблица) и относящийся к ферментам «домашнего хозяйства». Возможно, эти метилтрансферазы происходят от общего предка. Экспрессия гена метилтрансферазы *rlmA<sup>I</sup>* *Bacillus subtilis* регулируется за счет аттенуации транскрипции и трансляции, по всей видимости, чтобы минимизировать вредное влияние метилирования на приспособленность в отсутствие антибиотика [25], что делает спорным отнесение подобных ферментов к генам «домашнего хозяйства».

Любопытно, что для повышения устойчивости (MIC) *Streptococcus pneumoniae* с дважды метилированным A2058 к синтетическому производному эритромицина, телитромицину с 2 до 32 мкг/мл нужна не экспрессия, как в случае с тилозином, а инактивация гена *rlmA<sup>I</sup>* и соответственно отсутствие метилирования G748 23S рРНК [26]. Эта особенность объясняется, по-видимому, тем, что участок связывания телитромицина не перекрывается с расположением метильной группы, а наоборот, расположен так, чтобы было возможно взаимодействие между модифицированным нуклеотидом и антибиотиком (рис. 1, в). Нуклеотидный остаток  $m^5U747$  23S рРНК, образующийся посредством конститутивной метилтрансферазы RlmCD [27] (рис. 1, з) и соседствующий с G748, способствует узнаванию последнего метилтрансферазой RlmA<sup>I</sup> и, соответственно, косвенно способствует связыванию телитромицина [28].

Итак, на примере макролидов мы видим, что метилирование рРНК может приводить к устойчивости к антибиотикам за счет перекрывания метильных групп с участком связывания антибиотика, а также к чувствительности к антибиотикам за счет взаимодействия метильной группы с антибиотиком. Также на данном примере можно иллюстрировать взаимоисключающее филогенетическое распространение рРНК метилтрансфераз (*rlmA<sup>I</sup>* и *rlmA<sup>II</sup>*) и кооперативность в процессе модификации (RlmCD и RlmA<sup>I</sup>).

#### МЕТИЛИРОВАНИЕ НУКЛЕОТИДНЫХ ОСТАТКОВ 23S рРНК, НАХОДЯЩИХСЯ В ПТЦ

Пептидилтрансферазный центр – это главный ферментативный центр рибосомы, функ-

## pPHK метилтрансферазы, активность которых влияет на устойчивость к антибиотикам

ID	Название	Продукт	Встречаемость	Отношение метилирования к антибиотикорезистентности	Механизм влияния на активность антибиотика	Предположительный предковый фермент*
P36999	RlmA <sup>I</sup>	m <sup>1</sup> G745	грамотрицательные бактерии	чувствительность: виомицин (умеренно)	предположительно конформационное изменение	RlmA <sup>II**</sup>
Q9S1M6	RlmA <sup>II</sup>	m <sup>1</sup> G748	продуцент тилозина <i>Streptomyces roseoflavus</i> , другие грамположительные бактерии	устойчивость: тилозин чувствительность: телитромицин	непосредственное стерическое препятствие; гидрофобный контакт	RlmA <sup>I**</sup>
P18644	TsnR	Am1067	продуцент тиострептона, <i>Streptomyces azureus</i>	устойчивость: тиострепто-тон	непосредственное стерическое препятствие	TrmH, RlmB
P9WJ63	TlyA	Cm1920 (а также Cm1409 16S pPHK)	патоген <i>Mycobacterium tuberculosis</i> и некоторые другие бактерии	чувствительность: капреомицин, виомицин	предположительно гидрофобный контакт или конформационное изменение	
P13956	Erm семейство	m <sup>2</sup> A2058 23S pPHK	множество продуцентов и патогенов	устойчивость: макролиды, линкозамиды, стрептограммины Б	непосредственное стерическое препятствие	RsmA(KsgA)
P97178	TlrD	m <sup>6</sup> A2058 23S pPHK	продуцент тилозина <i>Streptomyces roseoflavus</i> , другие продуценты	устойчивость: линкозамиды, макролиды (умеренно)	непосредственное стерическое препятствие	RsmA(KsgA)
Q9FBG4	Cfr	m <sup>8</sup> A2503	патоген <i>Staphylococcus sciuri</i> и другие	устойчивость: фениколы, линкозамиды, оксазалидиноны, плевромугилины, стрептограммины А	непосредственное стерическое препятствие	RlmN
P36979	RlmN	m <sup>2</sup> A2503	у всех бактерий	чувствительность: линезалид, спарсомицин, тиамулин (умеренно)	предположительно конформационное изменение	
Q9F5K6	AviRb	Um2479	продуцент авиламицина <i>Streptomyces viridochromogenes</i>	устойчивость: авиламицин	непосредственное стерическое препятствие	TrmH, RlmB
Q93CQ2	EmtA	mG2470	патоген <i>Enterococcus faecium</i> и другие	устойчивость: виламицин, эверниамицин	непосредственное стерическое препятствие	THUMPD3, RlmKL, Trm14
Q9F5K5	AviRa	mG2535	продуцент авиламицина, <i>Streptomyces viridochromogenes</i>	устойчивость: авиламицин (умеренно)	непосредственное стерическое препятствие	
P0A6U5	RsmG	m <sup>7</sup> G527	у всех бактерий	чувствительность: стрептомицин (умеренно)	неизвестно	
неизвестно	Pct	m <sup>1</sup> A964	продуцент пактамицина <i>Streptomyces pactum</i>	устойчивость: пактамицин	непосредственное стерическое препятствие	

Окончание таблицы

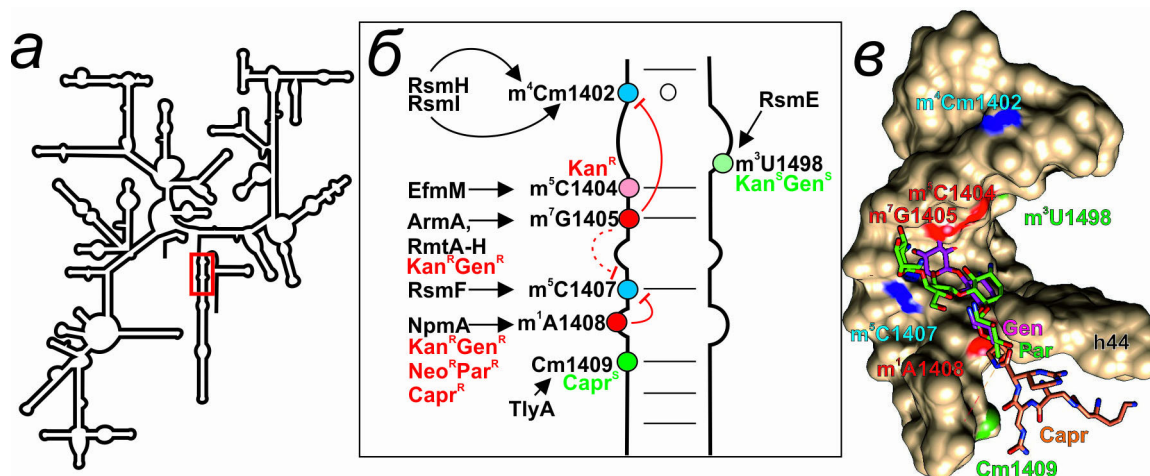
ID	Название	Продукт	Встречаемость	Отношение метилирования к антибиотикорезистентности	Механизм влияния на активность антибиотика	Предположительный предковый фермент*
P0ADX9	RsmD	m <sup>2</sup> G966	у всех бактерий	устойчивость: тетрациклин (умеренно) чувствительность: тигециклин (умеренно)	неизвестно	RsmF
E9KIK3	EfmM	m <sup>5</sup> C1404	патоген <i>E. faecium</i>	устойчивость: канамицин, тобрамицин (умеренно)		
Q6F5A0	ArmA	m <sup>7</sup> G1405	патоген <i>Klebsiella pneumoniae</i> и другие	устойчивость: аминокликозиды с 4-6 замещенным дезоксистрептамином	непосредственное стерическое препятствие	
Q33DX5	RmtA-H	m <sup>7</sup> G1405	патоген <i>Pseudomonas aeruginosa</i> и другие	устойчивость: аминокликозиды с 4-6 замещенным дезоксистрептамином	непосредственное стерическое препятствие	
Q53316	KgmB и другие	m <sup>7</sup> G1405	продуцент небрамицина <i>Streptomyces tenebrarius</i> и другие	устойчивость: аминокликозиды с 4-6 замещенным дезоксистрептамином	непосредственное стерическое препятствие	
A8C927	NpmA	m <sup>1</sup> A1408	патоген <i>Escherichia coli</i>	устойчивость: аминокликозиды с 4-6 и 4-5 замещенным дезоксистрептамином	непосредственное стерическое препятствие	TrmB
P25920	KamB	m <sup>1</sup> A1408	Продуцент тобрамицина <i>S. tenebrarius</i>	устойчивость: аминокликозиды с 4-6 и 4-5 замещенным дезоксистрептамином	непосредственное стерическое препятствие	TrmB
A6YEH1	CmnU	m <sup>1</sup> A1408	продуцент капреомицина <i>Streptomyces capreolus</i>	устойчивость: капреомицин	непосредственное стерическое препятствие	TrmB
P9WJ63	TlyA	Cm1409 (а также Cm1920 23S рРНК)	патоген <i>Mycobacterium tuberculosis</i> и некоторые другие бактерии	чувствительность: капреомицин, виомицин	предположительно гидрофобный контакт или конформационное изменение	
P0AGL7	RsmE	m <sup>3</sup> U1498	у всех бактерий	чувствительность: аминокликозиды с 4-6 и 4-5 замещенным дезоксистрептамином (умеренно)	предположительно конформационное изменение	
P06992	RsmA (KsgA)	m <sup>2</sup> <sup>6</sup> A1518/19	у всех организмов	чувствительность: касугамицин	конформационное изменение	

\* Сходство аминокислотных последовательностей определяли с помощью программы Blast [8].

\*\* RlmA<sup>I</sup> и RlmA<sup>II</sup> являются паралогами, присутствующими у грамотрицательных и грамположительных бактерий соответственно.

ция которого заключается в полимеризации присоединенных к тРНК аминокислот. ПТЦ содержит множество нуклеотидных остатков, модифицированных ферментами «домашнего хо-

зяйства» [2], а также нуклеотидные остатки, модификация которых влияет на устойчивость к антибиотикам. Так, модификация нуклеотидного остатка A2503 23S рРНК (рис. 1, б и д) блоки-



**Рис. 2.** Влияние модифицированных нуклеотидных остатков ДЦ 16S рРНК на взаимодействие с антибиотиками. *а* – Схема вторичной структуры 16S рРНК. Красным прямоугольником обозначена область, рассмотрению которой посвящены другие панели рисунка. *б* – Вторичная структура участка спирали 44 16S рРНК, образующей часть ДЦ. Модифицированные нуклеотидные остатки, обсуждаемые в тексте обозначены цветными кружками и подписаны. Красным выделены модификации устойчивости к антибиотикам ( $Kan^R$  $Gen^R$  – устойчивость к канамицину и гентамицину, аминогликозидам, содержащим 4-6 замещенный остаток дезоксистрептамина;  $Neo^R$  $Par^R$  – устойчивость к неомицину и паромомицину, аминогликозидам, содержащим 4-5 замещенный остаток дезоксистрептамина;  $Capr^R$  – устойчивость к капреомицину), а зеленым – модификации, способствующие связыванию антибиотиков (подписи соответствуют антибиотикам). Синими кружками показаны модификации ферментами «домашнего хозяйства». Стрелками показана активность модифицирующих ферментов (подписаны), направленная на соответствующие нуклеотидные остатки. Красные линии, заканчивающиеся чертой – ингибирующее влияние модификаций друг на друга. Пунктирная красная черта – влияние, поставленное под сомнение. *в* – Пространственная структура участка спирали 44 16S рРНК, образующей часть ДЦ (показана в виде молекулярной поверхности), и связанных с рибосомой антибиотиков гентамицина (4-6 замещенный аминогликозид, показан розовой проволочной моделью и подписан), паромомицина (4-5 замещенный аминогликозид, показан зеленой проволочной моделью и подписан) и капреомицина (показан оранжевой проволочной моделью и подписан). Красными, зелеными и синими Ван-дер-Ваальсовыми сферами показаны метильные группы нуклеотидных остатков, препятствующих, способствующих, а также не влияющих на связывание антибиотиков. При создании рисунка, включая наложение пространственных структур друг на друга и моделирование модифицированных нуклеотидных остатков, использовалась программа UCSF Chimera [10]. В создании рисунка использовались вторичные структуры рРНК [11], а также пространственные структуры 4V53 [51], 4V7M [52] и 4V51 [53]

рует связывание сразу нескольких классов антибиотиков. Метилирование по С8 атому метилтрансферазой Cfr делает клетки устойчивыми к действию фениколов, линкозамидов, оксазалидинонов, плевромутилинов и стрептрограмминов класса А [29]. Удивительно, что несмотря на широкое распространение гена *cfr* среди грамположительных и грамотрицательных бактерий, он не встречается у продуцентов антибиотиков. Эта модификация не стала постоянной у всех бактерий. Логично было бы предположить, что она оказывает отрицательный эффект на жизнедеятельность, однако на данный момент получены данные, свидетельствующие об очень небольшом замедлении роста бактерий при экспрессии *cfr* [30]. Экспрессия гена *cfr* изучена не настолько подробно, как генов *erm*, но в одном из обнаруженных патогенных штаммов *Staphylococcus aureus* рамке *cfr* предшествует небольшая, возможно, регуляторная рамка считывания. В другом случае гену *cfr* предшествует ген *ermB*, а промотор их общего оперона индуцируется

эритромицином, что вызывает устойчивость сразу к 7 классам антибиотиков [31].

Кроме Cfr, на нуклеотидный остаток A2503 23S рРНК также действует повсеместно распространенная метилтрансфераза «домашнего хозяйства» RlmN, присоединяющая метильную группу к атому С2 [32]. В отсутствие данного метилирования возникает не чувствительность, а небольшой уровень устойчивости к линезолиду [33]. Тем не менее приобретение умеренной устойчивости к антибиотикам в отсутствие этого метилирования, по-видимому, не перевешивает его пользы для функционирования рибосом. Клетки, лишенные метилтрансферазы RlmN, не способны поддерживать высокий уровень экспрессии рекомбинантных белков, а также демонстрируют умеренное увеличение количества интермедиатов сборки рибосомных субчастиц в случае культивирования при 20 °С [34]. Любопытно, что в клетках, лишенных модификации A2503 по С2 положению слабее происходит индукция экспрессии гена метилтрансфера-



зы *ermC*, что указывает на возможное взаимодействие этого модифицированного нуклеотидного остатка с растущим пептидом и его участие в регуляции синтеза белка [35].

Эволюционное происхождение гена *cfr* вызывает споры. Так, поиск родственных последовательностей позволяет говорить о родстве Cfr и RlmN, причем Cfr, как предполагается, произошел от RlmN, возможно, по эволюционной траектории, проходящей через гены РНК метилтрансфераз пластид [36]. В пользу общности происхождения этих ферментов говорит как то, что они модифицируют один и тот же нуклеотидный остаток, так и то, что они имеют одинаковый и довольно малораспространенный радикальный механизм метилирования [37, 38]. Тем не менее в других работах [39, 40] высказывается идея, что Cfr произошла от метилтрансферазы клостридий, родственной RlmN, однако имеющей другой субстрат, нежели A2503 23S рРНК. Учитывая, что RlmN проявляет двойную специфичность, будучи способной метилировать тРНК [41], можно предположить, что родственные RlmN и Cfr метилтрансферазы клостридий могут иметь не рРНК, а исключительно тРНК субстрат [39].

Только одна из довольно широко распространенных модификаций нуклеотидных остатков ПТЦ приводит к повышению устойчивости к антибиотикам, т.е. является своего рода конститутивной модификацией устойчивости. Это псевдоуридинирование нуклеотидного остатка U2504 при помощи фермента RluC [42], которое повышает устойчивость к действию тиамулина, клиндамицина и линезолида и, в меньшей степени, к действию хлорамфеникола, гиромидина А и спарсомидина [43]. Несмотря на то что RluC превращает сразу три уридина в псевдоуридины (955, 2504 и 2580), именно Ψ2504 (рис. 1, б) повышает устойчивость к перечисленным ингибиторам пептидилтрансферазной реакции.

Суммируя данный раздел, можно говорить как об эволюционировании рРНК метилтрансферазы устойчивости (Cfr) из конститутивной рРНК/тРНК метилтрансферазы (RlmN), так и о возможном превращении псевдоуридинсинтазы устойчивости в конститутивный модифицирующий фермент «домашнего хозяйства» (RluC).

#### МЕТИЛИРОВАНИЕ НУКЛЕОТИДНЫХ ОСТАТКОВ 16S рРНК, НАХОДЯЩИХСЯ В ДЦ

Второй важнейший функциональный центр рибосомы – декодирующий. Он расположен на

малой субчастице и образован, по большей части, спиралью 44 16S рРНК. Множество антибиотиков, в основном принадлежащих классу аминогликозидов, взаимодействует с этим участком рибосомы и вызывает ошибки декодирования [44], а также препятствует транслокации [45]. Устойчивость к аминогликозидам может возникнуть за счет метилирования нуклеотидных остатков ДЦ G1405 16S рРНК по N7 атому и A1408 16S рРНК по атому N1 [46] (рис. 2; таблица). Ферменты, способные осуществлять эти модификации, встречаются и у штаммов-продуцентов аминогликозидов, и у патогенных бактерий, куда они попали, скорее всего, в результате горизонтального переноса генов [46]. Так, m<sup>7</sup>G1405 образуется в рибосомах продуцентов аминогликозидов, содержащих 4–6 замещенный дезоксистрептамин, при помощи большого семейства сходных по структуре метилтрансфераз KgmB, Sgm, FmrO, GrmA, GrmB, GrmO, Kmr, NbrB и Srm1 [47]. Весьма широко распространены N7 метилтрансферазы ArgA и RmtA-N, приводящие к образованию нуклеотидного остатка m<sup>7</sup>G1405 16S рРНК у патогенных бактерий [48] и вызывающие устойчивость к аминогликозидам, содержащим 4–6 замещенный дезоксистрептамин, таким как канамицин и гентамицин (рис. 2, б и в; см. расположение гентамицина на панели в, показан розовым, и нуклеотидного остатка m<sup>7</sup>G1405 16S рРНК) [46]. Модификация m<sup>1</sup>A1408 16S рРНК приводит к устойчивости к более широкому спектру аминогликозидов, а именно содержащих как 4–6, так и 4–5 замещенный дезоксистрептамин, таким как неомицин и паромомицин (рис. 2, б и в; сравните расположение гентамицина и паромомицина на панели в, показаны розовым и зеленым соответственно, и нуклеотидного остатка m<sup>1</sup>A1408 16S рРНК). Эти метилтрансферазы встречаются у продуцентов аминогликозидов (KamA, KamB и KamC) и не родственного аминогликозидам противотуберкулезного антибиотика капреомицина (CmnU) [47]. Долгое время считалось, что у патогенных бактерий такого рода устойчивости нет, однако в 2007 г. у патогенной *Escherichia coli* была обнаружена подобная N1 A1408 метилтрансфераза NpmA [49]. Метилтрансферазы, модифицирующие N1 атом нуклеотидного остатка A1408, по-видимому, родственны между собой, как можно понять из сходства их аминокислотных последовательностей. Эволюционное происхождение всего этого семейства ферментов не вполне ясно. Возможно, оно произошло от тРНК-специфичной гуанин N7 метилтрансферазы TrmB [50].

Еще один механизм устойчивости к аминогликозидам (канамицину и тобрамицину, но не

гентамицину) связан с метилированием нуклеотидного остатка C1404 16S рРНК по C5 атому [54], осуществляемым метилтрансферазой EfmM, обнаруженной у патогенного штамма *Enterococcus faecium*. Этот белок похож на метилтрансферазу RsmF, от которой, возможно, происходит. Любопытно, что у *Thermus thermophilus* метилтрансфераза RsmF модифицирует сразу три нуклеотидных остатка C1400, C1404 и C1407 [55], свидетельствуя о достаточно легком эволюционировании субстратной специфичности подобных ферментов. Модификация m<sup>5</sup>C1404 располагается в непосредственной близости от сайта связывания канамицина [56], однако не перекрывается с ним, исключая стерическое препятствие, как механизм устойчивости. Об этом говорит также небольшая, 12-кратная, в случае экспрессии *efmM* в *E. coli*, разница в минимальной ингибирующей концентрации в присутствии и в отсутствие антибиотика. Удивительно, что связывание гентамицина, имеющего более объемную метиламиногруппу вместо незамещенной аминогруппы канамицина в месте контакта с метильной группой m<sup>5</sup>C1404, не нарушается в результате этого метилирования 16S рРНК. В научной литературе устойчивость к канамицину и тобрамицину, вызванную метилированием m<sup>5</sup>C1404 [54], связывают с вытеснением воды, взаимодействующей с антибиотиком. В случае гентамицина, наоборот, образование m<sup>5</sup>C1404 16S рРНК приводит к возникновению дополнительного гидрофобного контакта (рис. 2, б и в; см. расположение гентамицина на панели в, показан розовым, и нуклеотидного остатка m<sup>5</sup>C1404 16S рРНК).

Гидрофобным контактом может объясняться и взаимодействие капреомицина, антибиотика, используемого для борьбы с туберкулезом, с 2'-ОМе-группой Cm1409 [57]. У некоторых патогенных бактерий, включая *Mycobacterium* sp., *Campylobacter jejuni* и *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae*, была обнаружена метилтрансфераза TlyA, отвечающая за модификацию нуклеотидных остатков C1409 16S и C1920 23S рРНК по 2'-ОН-группе [58, 59]. Делеция или мутация гена *tlyA* у *Mycobacterium* sp. приводила к появлению устойчивости к капреомицину. При образовании мостика В2а между рибосомными субчастицами нуклеотидные остатки C1409 и C1920 оказываются сближенными. Структурные исследования показали, что здесь же располагаются и туберактиномицины – виомицин и капреомицин [52]. Метилирование обеих субчастиц делает рибосому более чувствительной к этим антибиотикам [59]. Кроме предположительного гидрофобного контакта Cm1409 с капреомицином (рис. 2, б и в; см. расположение капреомицина

на панели в, показан оранжевым, и нуклеотидного остатка Cm1409 16S рРНК), повышенная чувствительность к этому антибиотику рибосом, модифицированных TlyA, может объясняться изменением подвижности субчастиц друг относительно друга во время транслокации, так как туберактиномицины действуют именно на эту стадию работы рибосомы [60]. В ходе исследования ортологов гена *tlyA* оказалось, что есть два варианта этого белка – TlyA<sup>I</sup>, который модифицирует только C1920 23S рРНК и TlyA<sup>II</sup>, метилирующий нуклеотидные остатки обеих субчастиц. Экспрессия гена, кодирующего TlyA<sup>II</sup> в клетках *E. coli*, делает их более чувствительными к туберактиномицинам, но при этом не дает никакого преимущества при культивировании в отсутствие антибиотика [61]. В чем причина наличия гена *tlyA* у патогенных бактерий, если он приводит к увеличению чувствительности к антибиотикам? Возможно, белок TlyA обладает дополнительной функцией, кроме модификации рРНК. Было показано, что рекомбинантный белок TlyA проявляет гемолитическую активность *in vitro*, а при экспрессии его гена в *E. coli* присутствие этого белка было детектировано в мембране клетки [62]. На примере *C. jejuni* было показано, что наличие гена *tlyA* обуславливает вирулентность, причем мутации, подавляющие ферментативную активность TlyA, оказывают такой же эффект, как и удаление гена целиком. Значит именно метилирование вносит вклад в патогенность [58]. Несмотря на близость нуклеотидных остатков-мишеней TlyA к сайту связывания аминокликозидов, наличие или отсутствие этой метилтрансферазы никак не сказывается на эффективности действия аминокликозида амикацина. В то же время мутация расположенного рядом с сайтом метилирования нуклеотидного остатка A1408G обеспечивает устойчивость и к амикацину, и к капреомицину [63]. Интересно, что инактивация гена *tlyA* практически не сказывается на скорости роста бактерий без мутаций в рРНК, в то время как экспрессия *tlyA* повышает приспособленность бактерий с мутацией A1408G, что является весьма необычным типом взаимодействия метилирования и антибиотикорезистентности [63]. В данном случае можно говорить о том, что метилирование понижает фенотипическую стоимость устойчивости к антибиотикам, вызванной мутацией гена рРНК.

У продуцента капреомицина *Saccharothrix mutabilis* subsp. *Capreolus* был обнаружен ген, обеспечивающий защиту от собственного токсического продукта, *cmnU*, кодирующий гомолог метилтрансфераз, модифицирующих A1408 [64]. В случае идентичности продуктов метили-



рования устойчивость к капреомицину можно объяснить стерическим препятствием к связыванию (рис. 2, б и в; см. расположение капреомицина на панели в, показан оранжевым, и нуклеотидного остатка m<sup>1</sup>A1408 16S рРНК).

В ДЦ есть еще одна модификация, отсутствие которой у *Mycobacterium smegmatis* приводит к устойчивости к аминогликозидам. Это метилирование U1498 16S рРНК по N3 атому (рис. 2) [65], осуществляемое метилтрансферазой «домашнего хозяйства» RsmE [66]. Надо заметить, что уровень устойчивости изменяется примерно в 2 раза, что может быть объяснено косвенными причинами. Отсутствие данной модификации также не сильно сказывается на жизнедеятельности клеток в отсутствие антибиотика [66].

Чрезвычайно интересным является взаимоисключающее образование некоторых метилированных нуклеотидных остатков, обеспечивающих устойчивость к антибиотикам, и конститутивно метилируемых нуклеотидных остатков (рис. 2, б). Метилирование G1405 по N7 атому метилтрансферазой RmtC, обнаруженной у патогенной *E. coli*, снижает активность метилтрансферазы «домашнего хозяйства» RsmF, модифицирующей C1407 по C5 положению [67]. Фенотипическая «цена» метилирования G1405 метилтрансферазой RmtC практически отсутствует [68]. Инактивация гена *rsmF* немного замедляет скорость роста бактерий, не приводя к дефектам сборки рибосом [31], однако без этой метилтрансферазы значительно снижается способность клеток конкурировать с клетками дикого типа [67, 68], а устойчивость к аминогликозидам возрастает [68]. Позже это наблюдение было взято под сомнение, поскольку было показано, что родственная метилтрансфераза ArmA, модифицирующая тот же G1405 по N7 положению, блокирует активность не RsmF, а другой метилтрансферазы «домашнего хозяйства», RsmI [69], модифицирующей 2'-ОН нуклеотидного остатка C1402 [70]. Отсутствие метилирования Cm1402 может лишь частично объяснять значительное падение приспособленности бактерий, экспрессирующих *armA* в отсутствие антибиотиков [69], поскольку известно, что инактивация RsmI приводит к небольшому возрастанию частоты +1 и -1 сдвигов рамки считывания без сильного влияния на скорость роста бактерий [70].

Антагонизм модификации нуклеотидных остатков Cm1402 и m<sup>7</sup>G1405 16S рРНК наблюдался также у *Pseudomonas aeruginosa*, у которой в норме отсутствует ген метилтрансферазы RsmF. У этой бактерии метилтрансфераза RmtD, образующая m<sup>7</sup>G1405, также предотвращает

модификацию Cm1402 ферментом RsmI. В свою очередь, оказалось, что активность RsmF, формирующая m<sup>5</sup>C1407 16S рРНК, подавляется ферментом NpmA, метилирующим A1408 по N1 положению [69]. Экспрессия *npmA* не так значительно, как *armA*, сказывается на приспособленности клеток [69]. Гены, модифицирующие G1405 и A1408, встречаются и у штаммов-продуцентов аминогликозидов, и у патогенов, однако их экспрессия имеет разные последствия для эффективности роста. В отсутствие антибиотика штаммы патогенных бактерий с экспрессией генов метилтрансфераз устойчивости полностью пропадают при конкурентом культивировании, а в случае продуцентов антибиотиков экспрессия генов метилтрансфераз не оказывает столь отрицательного влияния на приспособленность [71].

Таким образом, из анализа метилирования ДЦ можно сделать несколько интересных выводов. Например, о крайне необычных взаимоисключающих взаимодействиях метилтрансфераз устойчивости и «домашнего хозяйства», а также о возможности ухудшать связывание антибиотика без перекрытия положений метильной группы и самого соединения, влияя на контакты, опосредованные водой. Также обращает на себя внимание положительная роль метилирования Cm1409 в связывании капреомицина, по-видимому, за счёт гидрофобного контакта.

### УСТОЙЧИВОСТЬ К ДРУГИМ АНТИБИОТИКАМ ЗА СЧЁТ МЕТИЛИРОВАНИЯ, СТЕРИЧЕСКИ ПРЕПЯТСТВУЮЩЕГО СВЯЗЫВАНИЮ

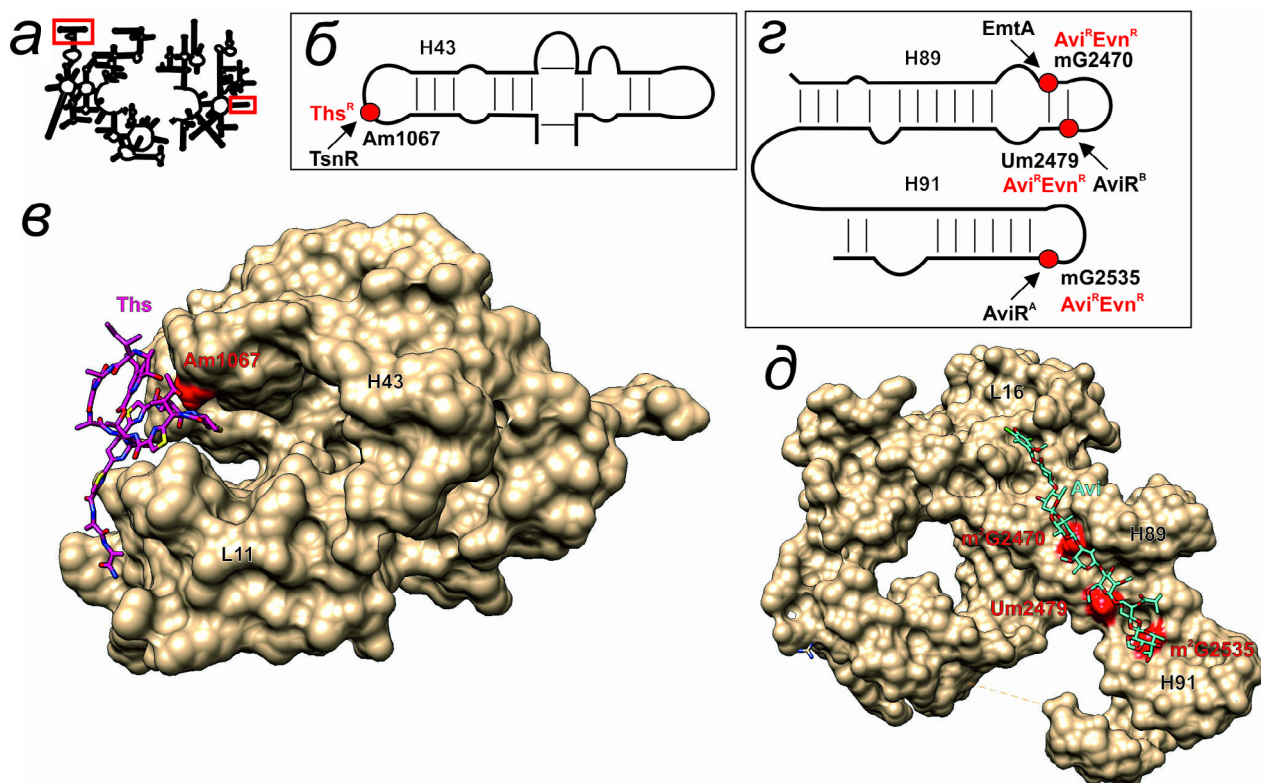
Помимо рассмотренных ранее примеров, когда метилирование рРНК вызывает устойчивость к антибиотикам, связывающимся в пептидном туннеле, пептидилтрансферазном центре и декодирующем центре, имеется ряд случаев, когда метилирование рРНК дает устойчивость к антибиотикам, связывающимся вне этих функциональных центров. Это, как правило, модификации рибосом продуцентов, защищающие свои рибосомы от производимого самой бактерией соединения.

Метилирование нуклеотидного остатка A1067 23S рРНК по 2'-ОН-группе рибозы (рис. 3, а и б; таблица) даёт устойчивость к тиострептону и микрокоцину [72]. Ген устойчивости, *tsnR*, в природе был обнаружен только у продуцентов тиострептона, например у штамма *Streptomyces azureus*. Оказалось, что метилтрансфераза TsnR модифицирует свободную 23S рРНК, а в присут-

ствии тиострептона или рибосомного белка L11 модификация не происходит [73]. Структура комплекса тиострептона и 50S субчастицы *Deinococcus radiodurans* (рис. 3, в) иллюстрирует механизм устойчивости – метилирование рибозы A1067 препятствует сближению петли 1 антибиотика и спирали H43 [74]. Основное преимущество данного антибиотика заключается в том, что он связывается вдалеке от большинства других ингибиторов синтеза белка и не демонстрирует перекрестной устойчивости с другими антибиотиками. Данных о влиянии этой модификации на приспособленность нет, но показано,

что рибосомы с модификацией и без одинаково обеспечивают ГТРАЗную активность фактора EF-G [75].

В кластере биосинтеза авиламицина, обнаруженного в геноме *Streptomyces viridochromogenes* Tü57, закодированы гены двух метилтрансфераз, *aviRa* и *aviRb*, экспрессия которых обеспечивает устойчивость к действию этого антибиотика, при этом экспрессия *aviRa* в *Streptomyces lividans* TK66 обеспечивает незначительный уровень устойчивости (10 мкг/мл), а *aviRb* – значительный (250 мкг/мл) [77]. Оказалось, что обе метилтрансферазы модифицируют нуклеотидные остат-



**Рис. 3.** Влияние модифицированных нуклеотидных остатков 23S рРНК на взаимодействие с тиострептоном и ортозомицинами. *а* – Схема вторичной структуры 23S рРНК. Красными прямоугольниками обозначены области, рассмотрению которых посвящены другие панели рисунка. *б* – Вторичная структура участка II домена 23S рРНК, взаимодействующего с факторами трансляции ГТРАЗы. Нуклеотидный остаток Am1067 23S рРНК, метилирование которого приводит к устойчивости к тиострептому (Ths<sup>R</sup>), выделен красным кружком. Стрелкой показана активность модифицирующего фермента TsnR (подписан). *в* – Пространственная структура участка рибосомы (показана в виде молекулярной поверхности), образующего участок связывания тиострептона (показан розовой проволочной моделью и подписан). Красными Ван-дер-Ваальсовыми сферами показана метильная группа нуклеотидного остатка Am1067 23S рРНК, перекрывающаяся с участком связывания тиострептона. Подписаны спираль 43 23S рРНК и белок L11. *г* – Вторичная структура спиралей 89 и 91 23S рРНК, образующих участок связывания ортозомицинов. Модифицированные нуклеотидные остатки, вызывающие устойчивость к эвернимидину (Evn<sup>R</sup>) и авиламицину (Avi<sup>R</sup>), обозначены красными кружками и подписаны. Черными стрелками показана активность модифицирующих ферментов (подписаны), направленная на соответствующие нуклеотидные остатки. *д* – Пространственная структура участка рибосомы (показана в виде молекулярной поверхности), образующего участок связывания ортозомицинов (авиламицин показан голубой проволочной моделью и подписан). Красными Ван-дер-Ваальсовыми сферами показаны метильные группы нуклеотидных остатков (подписаны), перекрывающиеся с участком связывания авиламицина. Подписаны спирали 89 и 91 23S рРНК и белок L16. При создании рисунка, включая наложение пространственных структур друг на друга и моделирование модифицированных нуклеотидных остатков, использовалась программа UCSF Chimera [10]. В создании рисунка использовались вторичные структуры рРНК [11], а также пространственные структуры 3CF5 [74] и 5KCR [76]

ки в рРНК: AviR<sup>a</sup> – G2535 по N1 или N2 положению (предположено исходя из данных по остановке обратной транскриптазы), а AviR<sup>b</sup> – U2479 по 2'-ОН-положению рибозы [78] (рис. 3, з; таблица). Устойчивость к авиламицину и родственному эверниамицину может быть также обеспечена за счет модификации G2470 метилтрансферазой EmtA (минимальная ингибирующая концентрация больше 256 мкг/мл) [79], обнаруженной на плазмиде у патогенной бактерии *E. faecium*. Структура комплекса авиламицина и эверниамицина с рибосомой *E. coli*, полученная методом криоэлектронной микроскопии, объясняет эффекты метилирования (рис. 3, д). Метильная группа, будучи присоединенной к 2'-ОН U2479, перекрывается с участком связывания антибиотика. Точное положение метильных групп, присоединяемых к G2535 и G2470, не определено, но исходя из того, что данные модификации обеспечивают устойчивость и блокируют обратную транскрипцию, можно предположить, что модификация проходит по N1 или N2 атомам. Исходя из структуры комплекса авиламицина с рибосомой [76] можно предположить, что для перекрывания метильных групп, присоединяемых как AviR<sup>a</sup>, так и EmtA, с антибиотиками этой группы метилированию должна подвергаться N2 аминогруппа. Об этом говорит и то, что Blast-поиск ферментов, схожих по последовательности с EmtA, позволяет идентифицировать возможное родство этого белка с гуанин-N2 РНК метилтрансферазами. О влиянии этих модификаций на эффективность роста бактерий в отсутствие антибиотиков на данный момент нет информации.

У продуцента пактомицина *Streptomyces pactum* метилирование A964 16S по N1 положению (таблица) обеспечивает устойчивость за счет ингибирования связывания этого антибиотика [80]. При этом мутации устойчивости к пактомицину A694G, C795U и C796U [81] располагаются в непосредственной близости от сайта связывания, определенного при помощи рентгеноструктурного анализа [82]. О роли метилирования A964 на эффективность роста на данный момент нет данных, в непосредственной близости расположены нуклеотидные остатки G966 и C967, модифицируемые метилтрансферазами «домашнего хозяйства» RsmD [83] и RsmB [84, 85] соответственно, участвующие в контроле соотношения скорости транскрипции и трансляции [86]. Неизвестно пока и о возможных функциональных взаимосвязях между модификацией A964 и соседних нуклеотидных остатков.

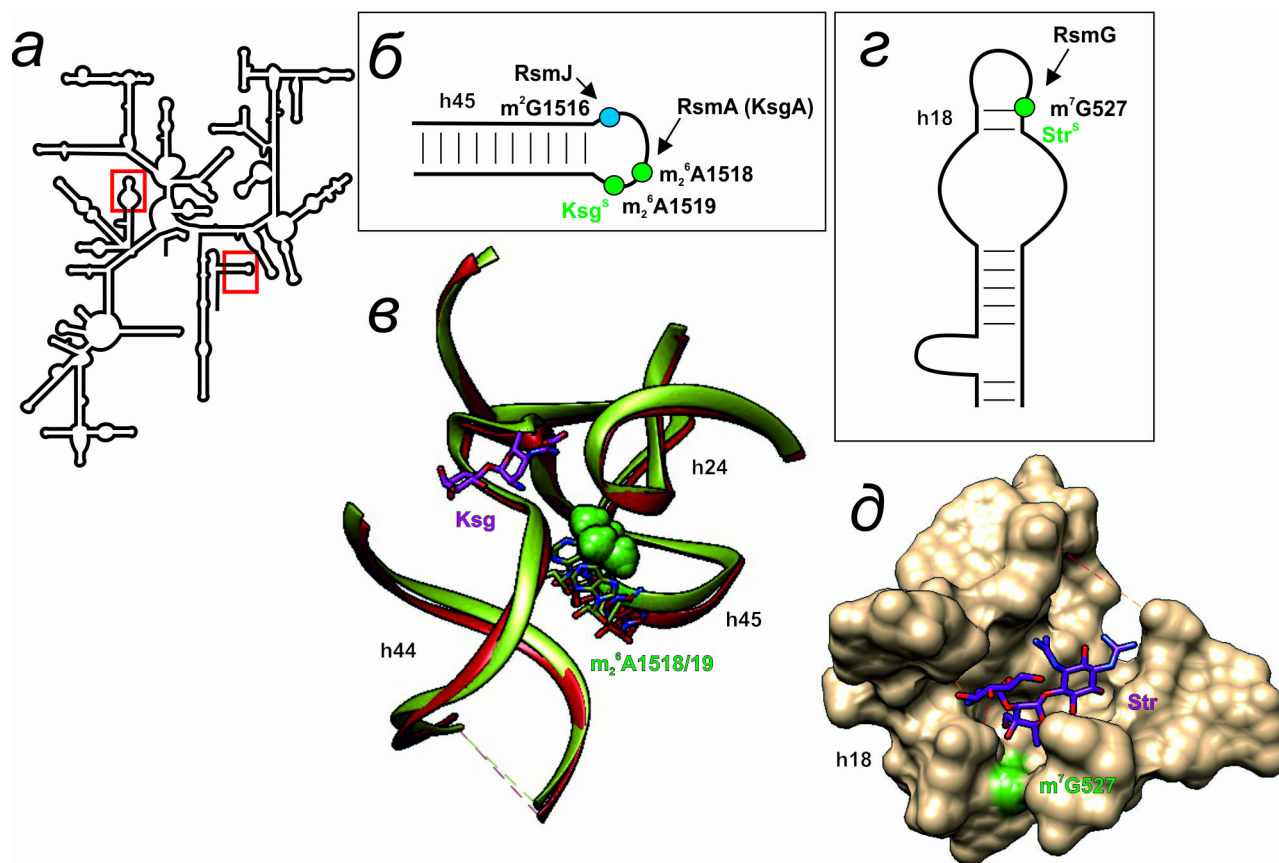
Из данного раздела можно сделать самый тривиальный вывод: где бы ни связывался антибиотик, даже вдали от тех участков, в которых

часто встречаются метилированные нуклеотидные остатки, присоединенные ферментами «домашнего хозяйства», устойчивость к нему может быть обеспечена метилированием рРНК.

### УСТОЙЧИВОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ ЗА СЧЕТ ОТСУТСТВИЯ МЕТИЛИРОВАНИЯ

Помимо устойчивости к антибиотикам, вызванной стерическими препятствиями из-за внесения в участок связывания дополнительной метильной группы рРНК метилтрансферазами, существует несколько прямо противоположных примеров (рис. 4; таблица). Наиболее известный из них – это устойчивость к касугамицину при отсутствии диметилирования нуклеотидных остатков A1518 и A1519 16S рРНК (рис. 4, а и б; таблица) по N6 положению [87]. Структура комплекса касугамицина с рибосомой (рис. 4, в) показала, что нуклеотидные остатки A1518/19 не контактируют с антибиотиком, поэтому наличие или отсутствие метильных групп вряд ли может напрямую влиять на связывание антибиотика, например, создавая гидрофобный контакт [88]. Позже эксперименты подтвердили возможность взаимодействия касугамицина с рибосомами, лишенными метилирования нуклеотидных остатков A1518/19 16S рРНК [89]. Несмотря на то что без метилирования A1518/19 клетки становятся устойчивыми к касугамицину и таким образом имеют определенное преимущество хотя бы в специфических условиях наличия в среде этого антибиотика, практически все про- и эукариоты имеют ортологичные метилтрансферазы. Структура рибосомы с немодифицированными A1518/19 показала, что метилирование необходимо для формирования структуры ДЦ малой субчастицы (рис. 4, в, сравните структуру нескольких спиралей 16S рРНК в рибосомах, содержащих (зеленый) и не содержащих (красный) метильные группы, вносимые RsmA(KsgA)) [90]. По всей видимости, именно изменение структуры 30S субчастицы и является причиной устойчивости к касугамицину при инактивации гена *rsmA(ksgA)*. Помимо этого, метилтрансфераза RsmA(KsgA) участвует в биогенезе 30S субчастицы как белок-переключатель [91]. Бактерии, лишенные этой метилтрансферазы, показывают сниженную скорость роста, а *Yersinia pestis* без RsmA(KsgA) проявляют меньшую вирулентность [92].

В отличие от большинства аминогликозидов, устойчивость к стрептомицину не может возникнуть за счет метилирования нуклеотидных остатков спирали 44 16S рРНК из-за отличающегося места связывания (рис. 4, д). Однако



**Рис. 4.** Влияние модифицированных нуклеотидных остатков 16S рРНК на взаимодействие с касугамицином и стрептомицином. *а* – Схема вторичной структуры 16S рРНК. Красными прямоугольниками обозначены области, рассмотрению которых посвящены другие панели рисунка. *б* – Вторичная структура спирали 45 16S рРНК. Модифицированные нуклеотидные остатки обозначены цветными кружками и подписаны. Зеленым выделены модификации, способствующие связыванию касугамицина, а синим – модификация ферментом «домашнего хозяйства», не влияющим на активность антибиотика. Стрелками показана активность модифицирующих ферментов (подписаны), направленная на соответствующие нуклеотидные остатки. *в* – Пространственная структура участка рибосомы (показана в виде трубчатой модели, спирали 16S рРНК подписаны), конформация которого зависит от метилированных нуклеотидных остатков  $m_2^6A1518/19$ . Зеленым показана структура, соответствующая рибосомам, содержащим метилированные, а красным – неметилированные нуклеотидные остатки A1518/19 (показаны проволоочной моделью соответствующих цветов и подписаны, метильные группы показаны зелеными Ван-дер-Ваальсовыми сферами). Касугамицин, взаимодействующий с рибосомой, содержащей метилированные нуклеотидные остатки, показан розовой проволоочной моделью и подписан. *г* – Вторичная структура спирали 18 16S рРНК, участвующей в образовании участка связывания стрептомицина. Нуклеотидный остаток  $m^7G527$ , модификация которого способствует активности стрептомицина, обозначен зеленым кружком и подписан. Черной стрелкой показана активность модифицирующего его фермента RsmG (подписан). *д* – Пространственная структура участка рибосомы (показана в виде молекулярной поверхности), образующего участок связывания стрептомицина (показан сиреневой проволоочной моделью и подписан). Зелеными Ван-дер-Ваальсовыми сферами показана метильная группа нуклеотидного остатка  $m^7G527$  16S рРНК (подписана). Подписана спираль 18 16S рРНК. При создании рисунка, включая наложение пространственных структур друг на друга и моделирование модифицированных нуклеотидных остатков, использовалась программа UCSF Chimera [10]. В создании рисунка использовались вторичные структуры рРНК [11], а также пространственные структуры 1J5E [93], 3OTO [90], 4V4N [94], 4NXM [95]

инактивация гена метилтрансферазы «домашнего хозяйства» RsmG, модифицирующей G527 16S рРНК по N7 положению (рис. 4, *а* и *г*; таблица), обеспечивает небольшой уровень устойчивости к данному антибиотику у штамма *Streptomyces coelicolor* [96]. В ходе дальнейших исследований было показано, что удаление гена *gidB* (гомолога *rsmG*, также модифицирующего

G527) у патогенных бактерий *M. tuberculosis* и *Salmonella enterica* также обеспечивает небольшую устойчивость к стрептомицину [97, 98]. Структура рибосомы в комплексе со стрептомицином (рис. 4, *д*) показывает, что нуклеотидный остаток G527 находится в непосредственной близости от места связывания антибиотика [99], но метильная группа не перекрывается напря-

ую с положением антибиотика. Предположение о том, что метилирование нуклеотидного остатка G527 16S рРНК приводит к конформационным изменениям не было подтверждено экспериментально [95]. Несмотря на отсутствие значительного влияния делеции гена *rsmG* на рост бактерий [34], на примере *Salmonella* было показано, что такие мутанты проигрывают конкуренцию штаммам дикого типа [98]. Хотя инактивация гена *rsmG* дает весьма небольшой уровень устойчивости к стрептомицину, по сравнению с мутациями в гене рибосомного белка S12, повреждение гена *rsmG* оказывается важной предпосылкой для дальнейшего появления этих мутаций. На примере *Bacillus subtilis* было показано, что делеция *rsmG* повышает точность трансляции, и при этом в таких штаммах значительно (в 200 раз) возрастает частота мутации устойчивости к стрептомицину в гене *rpsL*, кодирующем белок S12 [96]. Аналогичный результат был получен и для *E. coli*. На фоне делеции *rsmG*, обеспечивающей умеренную устойчивость к стрептомицину, повышается частота мутаций в *rpsL* (S12), еще сильнее увеличивающих устойчивость [100].

Активность RlmA<sup>II</sup> у *Bacillus subtilis*, как уже обсуждалось ранее, обеспечивает устойчивость к тилозину. В случае *E. coli* делеция гена его паралога *rlmA*<sup>I</sup>, отвечающего за образование m<sup>1</sup>G745 23S рРНК, приводит к устойчивости к виомицину [101], несмотря на отсутствие контактов между виомицином и этим модифицированным нуклеотидным остатком. Согласно результатам экспериментов по футпринтингу, при делеции гена *rlmA*<sup>I</sup> скорее всего не происходит связывание антибиотика. Как и в случае других делеций генов метилтрансфераз «домашнего хозяйства», инактивация *rlmA*<sup>I</sup> имеет негативные последствия для приспособленности: снижается скорость роста, способность рибосомных субчастиц к ассоциации, а также эффективность трансляции [101]. Возможно, структурные изменения, снижающие эффективность взаимодействия субчастиц, также обуславливают устойчивость к виомицину, так как сайт связывания этого антибиотика расположен в непосредственной близости от межсубчастичного мостика B2a.

В сайте связывания тигециклина расположен нуклеотидный остаток m<sup>2</sup>G966 [102], модифицированный метилтрансферазой RsmD [83]. На примере *S. pneumoniae* было показано, что инактивация этой метилтрансферазы «домашнего хозяйства» приводит к небольшому повышению уровня устойчивости к тигециклину [103] (таблица). И наоборот, при делеции *rsmD* в клетках *E. coli* чувствительность к тетрациклину возрастает [104]. При некоторой противоречи-

вости данных наблюдений это один из немногих примеров, когда метилтрансфераза «домашнего хозяйства» обеспечивает некоторый уровень устойчивости к антибиотикам. Мы также видим, что нередко для чувствительности к антибиотикам нужны модифицированные ферментами «домашнего хозяйства» нуклеотидные остатки.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Антибиотики – один из инструментов, используемый живыми организмами в конкурентной борьбе за ресурсы и территорию, при этом механизмы устойчивости обеспечивают возможность продуцирования антибиотиков или выживания в их присутствии. Большинство известных ингибиторов синтеза белка связываются в функциональных центрах рибосомы. Эти центры также обогащены модифицированными, в основном метилированными, нуклеотидными остатками [2]. Как видно, метилирование рРНК является одним из основных механизмов устойчивости к антибиотикам, причем высокий уровень устойчивости даёт присоединение метильных групп так, что их положение начинает перекрываться с участком связывания антибиотика. Однако это не единственный механизм устойчивости, вызванной метилированием. На примере EfmM видно, что метилирование может, предположительно, вытеснять молекулу воды, опосредующую дополнительный контакт антибиотика и рРНК.

Необычной, на первый взгляд, кажется ситуация, когда метилирование рРНК способствует связыванию антибиотика. Тем не менее это не редкость. В некоторых случаях можно предположить, что антибиотик напрямую контактирует с метильной группой, формируя гидрофобные или Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия. Такой механизм можно предположить для взаимодействия капреомицина с Cm1409 16S рРНК или телитромицина с m<sup>1</sup>G748. При отсутствии прямого контакта метильной группы рРНК с антибиотиком влияние на активность последнего может быть опосредовано конформационным изменением рРНК, зависящим от метилирования. Подобное явление хорошо документировано для влияния m<sup>2</sup>A1518/19 16S рРНК на активность касугамицина. Подозревать подобный механизм можно в случае m<sup>2</sup>A2503 23S рРНК и линезолида, спарсомицина и тиамулина, m<sup>3</sup>U1498 16S рРНК и аминогликозидов, m<sup>1</sup>G745 23S рРНК и виомицина. Сложнее объяснить, как метильная группа рРНК может способствовать связыванию антибиотика, если не удастся наблюдать ни контакт между ними, ни



изменение конформации, как например, в случае m<sup>7</sup>G527 16S рРНК и стрептомицина. Тогда можно подозревать либо то, что взаимодействие или изменение конформации реализуется в каком-то другом функциональном, возможно, промежуточном состоянии транслирующей рибосомы, либо что метилирование влияет на связывание антибиотика опосредованно, например, через вытеснение молекулы воды.

Интересны эволюционные взаимоотношения метилтрансфераз, вызывающих устойчивость к антибиотикам, и метилтрансфераз «домашнего хозяйства». Согласно общепринятому взгляду, последние распространяются «вертикально», т.е. эволюционируют вместе с соответствующими таксонами. Метилтрансферазы, обеспечивающие устойчивость к антибиотикам, характерны либо для узкой группы соответствующих видов-продуцентов, либо распространяются путем «горизонтального переноса генов», при том что исходно также происходят от соответствующих ферментов бактерий-продуцентов. Если же задаваться вопросом, откуда появились метилтрансферазы устойчивости у бактерий, производящих антибиотики, и, возможно, у некоторых других, можно представить себе сценарий, в котором ферменты «домашнего хозяйства» служат резервуаром для эволюции антибиотикорезистентности. Наиболее вероятен такой ход событий для появления метилтрансфераз семейства Erm из белков RsmA(KsgA). Возможно ли обратное, т.е. превращение метилтрансферазы устойчивости в метилтрансферазу «домашнего хозяйства»? Антибиотики и механизмы устойчивости к ним эволюционируют давно, и биосинтез антибиотиков, теоретически, может совершенствоваться таким образом, чтобы избежать устойчивости. Возможно, что повсеместное распространение генов устойчивости может превратить последние в вариант метилтрансфераз «домашнего хозяйства». Это возможно при условии, что метилирование не будет иметь негативных последствий, а возможно окажется полезным для приспособленности бактерий в отсутствие антибиотиков. «Цена» метилирования, вызывающего устойчивость к антибиотикам, может варьировать от значительной потери приспособленности, например при

метилировании A2058 23S рРНК ферментами Erm семейства, до практически нулевой, например при метилировании A1408 белком NpmA. Удивителен пример снижения «цены» устойчивости к амикацину, вызванной мутацией A1408G 16S рРНК при помощи метилтрансферазы TlyA, модифицирующей соседний нуклеотидный остаток.

В научной литературе можно найти очень мало примеров, не противоречащих возможному эволюционному происхождению ферментов «домашнего хозяйства» от метилтрансфераз антибиотикорезистентности. Модифицирующие ферменты RsmD и RluC, принадлежащие к когорте ферментов «домашнего хозяйства», приводят к некоторому уровню устойчивости к тетрациклину и тиамулину, клиндамицину и линезолиду соответственно. Метилтрансфераза RlmA<sup>II</sup>, необходимая для образования m<sup>1</sup>G748 23S рРНК и весьма широко распространенная среди грамположительных бактерий, обеспечивает некоторый уровень устойчивости к тилозину. Остается открытым вопрос: могут ли эти белки происходить от ферментов устойчивости к предковым антибиотикам, связывавшимся примерно в тех же участках, что и вышеперечисленные современные?

Хотя в прошлом исследование рРНК метилтрансфераз во многом ограничивалось модельными организмами и патогенами, а в поиске продуцентов антибиотиков преобладал сугубо утилитарный подход, диктуемый медицинской значимостью, будущее, на взгляд авторов данного обзора, принадлежит комплексным исследованиям совместной эволюции как системы модификации рибосом, так и биосинтеза антибактериальных соединений.

**Финансирование.** Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (гранты №№ 20-04-00736 и 20-54-53014).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Arenz, S., and Wilson, D. N. (2016) Bacterial protein synthesis as a target for antibiotic inhibition, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **6**, a025361, doi: 10.1101/cshperspect.a025361.
2. Sergiev, P. V., Aleksashin, N. A., Chugunova, A. A., Polikanov, Y. S., and Dontsova, O. A. (2018) Structural and evolutionary insights into ribosomal RNA methylation, *Nat. Chem. Biol.*, **14**, 226-235.
3. Bogdanov, A. A., Sumbatyan, N. V., Shishkina, A. V., Karpenko, V. V., and Korshunova, G. A. (2010) Ribosomal tunnel and translation regulation, *Biochemistry (Moscow)*, **75**, 1501-1516.



4. Skinner, R., Cundliffe, E., and Schmidt, F. J. (1983) Site of action of a ribosomal RNA methylase responsible for resistance to erythromycin and other antibiotics, *J. Biol. Chem.*, **258**, 12702-12706.
5. Pernodet, J. L., Fish, S., Blondelet-Rouault, M. H., and Cundliffe, E. (1996) The macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance phenotypes characterized by using a specifically deleted, antibiotic-sensitive strain of *Streptomyces lividans*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **40**, 581-585.
6. Roberts, M. C., Sutcliffe, J., Courvalin, P., Jensen, L. B., Rood, J., and Seppala, H. (1999) Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **43**, 2823-2830.
7. Arthur, M., Brisson-Noël, A., and Courvalin, P. (1987) Origin and evolution of genes specifying resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics: data and hypotheses, *J. Antimicrob. Chemother.*, **20**, 783-802.
8. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.*, **215**, 403-410.
9. Bhujbalrao, R., and Anand, R. (2019) Deciphering determinants in ribosomal methyltransferases that confer antimicrobial resistance, *J. Am. Chem. Soc.*, **141**, 1425-1429.
10. Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., and Ferrin, T. E. (2004) UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis, *J. Comput. Chem.*, **25**, 1605-1612.
11. The RNAcentral Consortium (2019) RNAcentral: a hub of information for non-coding RNA sequences, *Nucleic Acids Res.*, **47**, D221-D229.
12. Hansen, J. L., Ippolito, J. A., Ban, N., Nissen, P., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2002) The structures of four macrolide antibiotics bound to the large ribosomal subunit, *Mol. Cell*, **10**, 117-128.
13. Bulkley, D., Innis, C. A., Blaha, G., and Steitz, T. A. (2010) Revisiting the structures of several antibiotics bound to the bacterial ribosome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **107**, 17158-17163.
14. Svetlov, M. S., Plessa, E., Chen, C.-W., Bougas, A., Krokidis, M. G., Dinos, G. P., and Polikanov, Y. S. (2019) High-resolution crystal structures of ribosome-bound chloramphenicol and erythromycin provide the ultimate basis for their competition, *RNA*, **25**, 600-606.
15. Gupta, P., Sothiselvam, S., Vázquez-Laslop, N., and Mankin, A. S. (2013) Deregulation of translation due to post-transcriptional modification of rRNA explains why erm genes are inducible, *Nat. Commun.*, **4**, 1984.
16. Subramanian, S. L., Ramu, H., and Mankin, A. S. (2012) Inducible resistance to macrolide antibiotics, in *Antibiotic Discovery and Development* (Dougherty, T. J., and Pucci, M. J., eds), Springer US, Boston, MA, pp. 455-484.
17. Vázquez-Laslop, N., Thum, C., and Mankin, A. S. (2008) Molecular mechanism of drug-dependent ribosome stalling, *Mol. Cell*, **30**, 190-202.
18. Arenz, S., Ramu, H., Gupta, P., Berninghausen, O., Beckmann, R., Vázquez-Laslop, N., Mankin, A. S., and Wilson, D. N. (2014) Molecular basis for erythromycin-dependent ribosome stalling during translation of the ErmBL leader peptide, *Nat. Commun.*, **5**, 3501.
19. Weisblum, B. (1995) Insights into erythromycin action from studies of its activity as inducer of resistance, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **39**, 797-805.
20. Kwak, J. H., Choi, E. C., and Weisblum, B. (1991) Transcriptional attenuation control of ermK, a macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinant from *Bacillus licheniformis*, *J. Bacteriol.*, **173**, 4725-4735.
21. Morris, R. P., Nguyen, L., Gatfield, J., Visconti, K., Nguyen, K., Schnappinger, D., Ehrt, S., Liu, Y., Heifets, L., Pieters, J., Schoolnik, G., and Thompson, C. J. (2005) Ancestral antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **102**, 12200-12205.
22. Gupta, P., Kannan, K., Mankin, A. S., and Vázquez-Laslop, N. (2013) Regulation of gene expression by macrolide-induced ribosomal frameshifting, *Mol. Cell*, **52**, 629-642.
23. Liu, M., and Douthwaite, S. (2002) Resistance to the macrolide antibiotic tylosin is conferred by single methylations at 23S rRNA nucleotides G748 and A2058 acting in synergy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **99**, 14658-14663.
24. Liu, M., and Douthwaite, S. (2002) Methylation at nucleotide G745 or G748 in 23S rRNA distinguishes Gram-negative from Gram-positive bacteria, *Mol. Microbiol.*, **44**, 195-204.
25. Yakhnin, H., Yakhnin, A. V., Mouery, B. L., Mandell, Z. F., Karbasiafshar, C., Kashlev, M., and Babitzke, P. (2019) NusG-dependent RNA polymerase pausing and tylosin-Dependent ribosome stalling are required for tylosin resistance by inducing 23S rRNA methylation in *Bacillus subtilis*, *mBio*, **10**, e02665-19.
26. Takaya, A., Sato, Y., Shoji, T., and Yamamoto, T. (2013) Methylation of 23S rRNA nucleotide G748 by RlmA<sup>II</sup> methyltransferase renders *Streptococcus pneumoniae* telithromycin susceptible, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **57**, 3789-3796.
27. Desmolaize, B., Fabret, C., Brégeon, D., Rose, S., Grosjean, H., and Douthwaite, S. (2011) A single methyltransferase YefA (RlmCD) catalyses both m5U747 and m5U1939 modifications in *Bacillus subtilis* 23S rRNA, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 9368-9375.
28. Shoji, T., Takaya, A., Sato, Y., Kimura, S., Suzuki, T., and Yamamoto, T. (2015) RlmCD-mediated U747 methylation promotes efficient G748 methylation by methyltransferase RlmA<sup>II</sup> in 23S rRNA in *Streptococcus pneumoniae*; interplay between two rRNA methylations responsible for telithromycin susceptibility, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 8964-8972.
29. Long, K. S., Poehlsaard, J., Kehrenberg, C., Schwarz, S., and Vester, B. (2006) The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to Phenicol, Lincosamides, Oxazolidinones, Pleuromutilins, and Streptogramin A antibiotics, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **50**, 2500-2505.
30. LaMarre, J. M., Locke, J. B., Shaw, K. J., and Mankin, A. S. (2011) Low fitness cost of the multidrug resistance gene *cfr*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **55**, 3714-3719.
31. Smith, L. K., and Mankin, A. S. (2008) Transcriptional and translational control of the mlr operon, which confers resistance to seven classes of protein synthesis inhibitors, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **52**, 1703-1712.
32. Toh, S.-M., Xiong, L., Bae, T., and Mankin, A. S. (2008) The methyltransferase YfgB/RlmN is responsible for modification of adenosine 2503 in 23S rRNA, *RNA*, **14**, 98-106.
33. LaMarre, J. M., Howden, B. P., and Mankin, A. S. (2011) Inactivation of the indigenous methyltransferase RlmN in *Staphylococcus aureus* increases linezolid resistance, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **55**, 2989-2991.
34. Pletnev, P., Guseva, E., Zanina, A., Evfratov, S., Dzama, M., et al. (2020) Comprehensive functional analysis of *Escherichia coli* ribosomal RNA methyltransferases, *Front. Genet.*, **11**, 97.
35. Vázquez-Laslop, N., Ramu, H., Klepacki, D., Kannan, K., and Mankin, A. S. (2010) The key function of a conserved and modified rRNA residue in the ribosomal response to the nascent peptide, *EMBO J.*, **29**, 3108-3117.
36. Kaminska, K. H., Purta, E., Hansen, L. H., Bujnicki, J. M., Vester, B., and Long, K. S. (2010) Insights into the structure, function and evolution of the radical-SAM 23S rRNA

- methyltransferase Cfr that confers antibiotic resistance in bacteria, *Nucleic Acids Res.*, **38**, 1652-1663.
37. Giessing, A. M. B., Jensen, S. S., Rasmussen, A., Hansen, L. H., Gondela, A., Long, K., Vester, B., and Kirpekar, F. (2009) Identification of 8-methyladenosine as the modification catalyzed by the radical SAM methyltransferase Cfr that confers antibiotic resistance in bacteria, *RNA*, **15**, 327-336.
  38. Yan, F., LaMarre, J. M., Röhrich, R., Wiesner, J., Jomaa, H., Mankin, A. S., and Fujimori, D. G. (2010) RlmN and Cfr are radical SAM enzymes involved in methylation of ribosomal RNA, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 3953-3964.
  39. Atkinson, G. C., Hansen, L. H., Tenson, T., Rasmussen, A., Kirpekar, F., and Vester, B. (2013) Distinction between the Cfr methyltransferase conferring antibiotic resistance and the housekeeping RlmN methyltransferase, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **57**, 4019-4026.
  40. Stojković, V., Noda-Garcia, L., Tawfik, D. S., and Fujimori, D. G. (2016) Antibiotic resistance evolved via inactivation of a ribosomal RNA methylating enzyme, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 8897-8907.
  41. Benítez-Páez, A., Villarroja, M., and Armengod, M.-E. (2012) The *Escherichia coli* RlmN methyltransferase is a dual-specificity enzyme that modifies both rRNA and tRNA and controls translational accuracy, *RNA*, **18**, 1783-1795.
  42. Conrad, J., Sun, D., Englund, N., and Ofengand, J. (1998) The *rbcC* gene of *Escherichia coli* codes for a pseudouridine synthase that is solely responsible for synthesis of pseudouridine at positions 955, 2504, and 2580 in 23 S ribosomal RNA, *J. Biol. Chem.*, **273**, 18562-18566.
  43. Toh, S.-M., and Mankin, A. S. (2008) An indigenous post-transcriptional modification in the ribosomal peptidyl transferase center confers resistance to an array of protein synthesis inhibitors, *J. Mol. Biol.*, **380**, 593-597.
  44. Davies, J., Gorini, L., and Davis, B. D. (1965) Misreading of RNA codewords induced by aminoglycoside antibiotics, *Mol. Pharmacol.*, **1**, 93-106.
  45. Hausner, T. P., Geigenmüller, U., and Nierhaus, K. H. (1988) The allosteric three-site model for the ribosomal elongation cycle. New insights into the inhibition mechanisms of aminoglycosides, thiostrepton, and viomycin, *J. Biol. Chem.*, **263**, 13103-13111.
  46. Doi, Y., and Arakawa, Y. (2007) 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides, *Clin. Infect. Dis.*, **45**, 88-94.
  47. Grosjean, H. (2009) *DNA and RNA modification enzymes: structure, mechanism, function and evolution*, Landes Bioscience, Austin, Tex.
  48. Doi, Y., Wachino, J., and Arakawa, Y. (2016) Aminoglycoside Resistance, *Infect. Dis. Clin. North Am.*, **30**, 523-537.
  49. Wachino, J., Shibayama, K., Kurokawa, H., Kimura, K., Yamane, K., et al. (2007) Novel plasmid-mediated 16S rRNA m1A1408 methyltransferase, NpmA, found in a clinically isolated *Escherichia coli* strain resistant to structurally diverse aminoglycosides, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **51**, 4401-4409.
  50. Macmaster, R., Zelinskaya, N., Savic, M., Rankin, C. R., and Conn, G. L. (2010) Structural insights into the function of aminoglycoside-resistance A1408 16S rRNA methyltransferases from antibiotic-producing and human pathogenic bacteria, *Nucleic Acids Res.*, **38**, 7791-7799.
  51. Borovinskaya, M. A., Pai, R. D., Zhang, W., Schuwirth, B. S., Holton, J. M., et al. (2007) Structural basis for aminoglycoside inhibition of bacterial ribosome recycling, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**, 727-732.
  52. Stanley, R. E., Blaha, G., Grodzicki, R. L., Strickler, M. D., and Steitz, T. A. (2010) The structures of the anti-tuberculosis antibiotics viomycin and capreomycin bound to the 70S ribosome, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **17**, 289-293.
  53. Selmer, M., Dunham, C. M., Murphy, F. V., Weixlbaumer, A., Petry, S., Kelley, A. C., Weir, J. R., and Ramakrishnan, V. (2006) Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA, *Science*, **313**, 1935-1942.
  54. Galimand, M., Schmitt, E., Panvert, M., Desmolaize, B., Douthwaite, S., Mechulam, Y., and Courvalin, P. (2011) Intrinsic resistance to aminoglycosides in *Enterococcus faecium* is conferred by the 16S rRNA m5C1404-specific methyltransferase EfmM, *RNA*, **17**, 251-262.
  55. Demirci, H., Larsen, L. H. G., Hansen, T., Rasmussen, A., Cadambi, A., Gregory, S. T., Kirpekar, F., and Jøgl, G. (2010) Multi-site-specific 16S rRNA methyltransferase RsmF from *Thermus thermophilus*, *RNA*, **16**, 1584-1596.
  56. François, B., Russell, R. J. M., Murray, J. B., Aboul-ela, F., Masquida, B., Vicens, Q., and Westhof, E. (2005) Crystal structures of complexes between aminoglycosides and decoding A site oligonucleotides: role of the number of rings and positive charges in the specific binding leading to miscoding, *Nucleic Acids Res.*, **33**, 5677-5690.
  57. Maus, C. E., Plikaytis, B. B., and Shinnick, T. M. (2005) Mutation of *tlyA* confers capreomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **49**, 571-577.
  58. Sałamaszyńska-Guz, A., Rose, S., Lykkebo, C. A., Taciak, B., Baçal, P., Uspieński, T., and Douthwaite, S. (2017) Biofilm formation and motility are promoted by Cj0588-directed methylation of rRNA in *Campylobacter jejuni*, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **7**, 533.
  59. Johansen, S. K., Maus, C. E., Plikaytis, B. B., and Douthwaite, S. (2006) Capreomycin binds across the ribosomal subunit interface using *tlyA*-encoded 2'-O-methylations in 16S and 23S rRNAs, *Mol. Cell*, **23**, 173-182.
  60. Ermolenko, D. N., Spiegel, P. C., Majumdar, Z. K., Hickerson, R. P., Clegg, R. M., and Noller, H. F. (2007) The antibiotic viomycin traps the ribosome in an intermediate state of translocation, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**, 493-497.
  61. Monshupanee, T., Johansen, S. K., Dahlberg, A. E., and Douthwaite, S. (2012) Capreomycin susceptibility is increased by *TlyA*-directed 2'-O-methylation on both ribosomal subunits, *Mol. Microbiol.*, **85**, 1194-1203.
  62. Rahman, A., Srivastava, S. S., Sneha, A., Ahmed, N., and Krishnasastri, M. V. (2010) Molecular characterization of *tlyA* gene product, Rv1694 of *Mycobacterium tuberculosis*: a non-conventional hemolysin and a ribosomal RNA methyl transferase, *BMC Biochem.*, **11**, 35.
  63. Freihofer, P., Akbergenov, R., Teo, Y., Juskeviciene, R., Andersson, D. I., and Böttger, E. C. (2016) Nonmutational compensation of the fitness cost of antibiotic resistance in mycobacteria by overexpression of *tlyA* rRNA methylase, *RNA*, **22**, 1836-1843.
  64. Felnagle, E. A., Rondon, M. R., Berti, A. D., Crosby, H. A., and Thomas, M. G. (2007) Identification of the biosynthetic gene cluster and an additional gene for resistance to the antituberculosis drug capreomycin, *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 4162-4170.
  65. Bijpuria, S., Sharma, R., and Taneja, B. (2020) Deletion of RsmE 16S rRNA methyltransferase leads to low level increase in aminoglycoside resistance in *Mycobacterium smegmatis*, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.01.15.907279.
  66. Basturea, G. N., Rudd, K. E., and Deutscher, M. P. (2006) Identification and characterization of RsmE, the founding member of a new RNA base methyltransferase family, *RNA*, **12**, 426-434.
  67. Andersen, N. M., and Douthwaite, S. (2006) YebU is a m5C methyltransferase specific for 16 S rRNA nucleotide 1407, *J. Mol. Biol.*, **359**, 777-786.

68. Gutierrez, B., Escudero, J. A., San Millan, A., Hidalgo, L., Carrilero, L., Ovejero, C. M., Santos-Lopez, A., Thomas-Lopez, D., and Gonzalez-Zorn, B. (2012) Fitness cost and interference of Arm/Rmt aminoglycoside resistance with the RsmF housekeeping methyltransferases, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **56**, 2335-2341.
69. Lioy, V. S., Goussard, S., Guerineau, V., Yoon, E.-J., Courvalin, P., Galimand, M., and Grillot-Courvalin, C. (2014) Aminoglycoside resistance 16S rRNA methyltransferases block endogenous methylation, affect translation efficiency and fitness of the host, *RNA*, **20**, 382-391.
70. Kimura, S., and Suzuki, T. (2010) Fine-tuning of the ribosomal decoding center by conserved methyl-modifications in the *Escherichia coli* 16S rRNA, *Nucleic Acids Res.*, **38**, 1341-1352.
71. Vidučić, D., Obranić, S., Matovina, M., Babić, F., and Vlahoviček, G. M. (2014) Host fitness effects of aminoglycoside resistance 16S rRNA G1405 and A1408 methyltransferases from clinical pathogens and natural antibiotic producers, *FEBS J.*, **281**, Suppl. s1, 285.
72. Thompson, J., Schmidt, F., and Cundliffe, E. (1982) Site of action of a ribosomal RNA methylase conferring resistance to thiostrepton, *J. Biol. Chem.*, **257**, 7915-7917.
73. Lentzen, G., Klinck, R., Matassova, N., Aboul-ela, F., and Murchie, A. I. H. (2003) Structural basis for contrasting activities of ribosome binding thiazole antibiotics, *Chem. Biol.*, **10**, 769-778.
74. Harms, J. M., Wilson, D. N., Schlutzen, F., Connell, S. R., Stachelhaus, T., Zaborowska, Z., Spahn, C. M. T., and Fucini, P. (2008) Translational regulation via L11: molecular switches on the ribosome turned on and off by thiostrepton and micrococcin, *Mol. Cell*, **30**, 26-38.
75. Cundliffe, E., and Thompson, J. (1981) The mode of action of nosiheptide (multhiomycin) and the mechanism of resistance in the producing organism, *J. Gen. Microbiol.*, **126**, 185-192.
76. Arenz, S., Juette, M. F., Graf, M., Nguyen, F., Huter, P., Polikanov, Y. S., Blanchard, S. C., and Wilson, D. N. (2016) Structures of the orthosomycin antibiotics avilamycin and evernimicin in complex with the bacterial 70S ribosome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 7527-7532.
77. Weitnauer, G., Gaisser, S., Trefzer, A., Stockert, S., Westrich, L., Quiros, L. M., Mendez, C., Salas, J. A., and Bechthold, A. (2001) An ATP-binding cassette transporter and two rRNA methyltransferases are involved in resistance to avilamycin in the producer organism *Streptomyces viridochromogenes* T57, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **45**, 690-695.
78. Treede, I., Jakobsen, L., Kirpekar, F., Vester, B., Weitnauer, G., Bechthold, A., and Douthwaite, S. (2003) The avilamycin resistance determinants AviRa and AviRb methylate 23S rRNA at the guanosine 2535 base and the uridine 2479 ribose, *Mol. Microbiol.*, **49**, 309-318.
79. Mann, P. A., Xiong, L., Mankin, A. S., Chau, A. S., Mendrick, C. A., et al. (2001) EmtA, a rRNA methyltransferase conferring high-level evernimicin resistance, *Mol. Microbiol.*, **41**, 1349-1356.
80. Ballesta, J. P., and Cundliffe, E. (1991) Site-specific methylation of 16S rRNA caused by pct, a pactamycin resistance determinant from the producing organism, *Streptomyces pactum*, *J. Bacteriol.*, **173**, 7213-7218.
81. Mankin, A. S. (1997) Pactamycin resistance mutations in functional sites of 16S rRNA, *J. Mol. Biol.*, **274**, 8-15.
82. Polikanov, Y. S., Osterman, I. A., Szal, T., Tashlitsky, V. N., Serebryakova, M. V., et al. (2014) Amicoumacin A inhibits translation by stabilizing mRNA interaction with the ribosome, *Mol. Cell*, **56**, 531-540.
83. Lesnyak, D. V., Osipiuk, J., Skarina, T., Sergiev, P. V., Bogdanov, A. A., et al. (2007) Methyltransferase that modifies guanine 966 of the 16S rRNA: functional identification and tertiary structure, *J. Biol. Chem.*, **282**, 5880-5887.
84. Gu, X. R., Gustafsson, C., Ku, J., Yu, M., and Santi, D. V. (1999) Identification of the 16S rRNA m5C967 methyltransferase from *Escherichia coli*, *Biochemistry*, **38**, 4053-4057.
85. Tscherne, J. S., Nurse, K., Popienick, P., Michel, H., Sochacki, M., and Ofengand, J. (1999) Purification, cloning, and characterization of the 16S rRNA m5C967 methyltransferase from *Escherichia coli*, *Biochemistry*, **38**, 1884-1892.
86. Prokhorova, I. V., Osterman, I. A., Burakovskiy, D. E., Serebryakova, M. V., Galyamina, M. A., et al. (2013) Modified nucleotides m(2)G966/m(5)C967 of *Escherichia coli* 16S rRNA are required for attenuation of tryptophan operon, *Sci. Rep.*, **3**, 3236.
87. Helser, T. L., Davies, J. E., and Dahlberg, J. E. (1972) Mechanism of kasugamycin resistance in *Escherichia coli*, *Nature New Biol.*, **235**, 6-9.
88. Schlutzen, F., Takemoto, C., Wilson, D. N., Kaminishi, T., Harms, J. M., et al. (2006) The antibiotic kasugamycin mimics mRNA nucleotides to destabilize tRNA binding and inhibit canonical translation initiation, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **13**, 871-878.
89. Vila-Sanjurjo, A., Squires, C. L., and Dahlberg, A. E. (1999) Isolation of kasugamycin resistant mutants in the 16S ribosomal RNA of *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.*, **293**, 1-8.
90. Demirci, H., Murphy, F., Belardinelli, R., Kelley, A. C., Ramakrishnan, V., Gregory, S. T., Dahlberg, A. E., and Jogl, G. (2010) Modification of 16S ribosomal RNA by the KsgA methyltransferase restructures the 30S subunit to optimize ribosome function, *RNA*, **16**, 2319-2324.
91. Connolly, K., Rife, J. P., and Culver, G. (2008) Mechanistic insight into the ribosome biogenesis functions of the ancient protein KsgA, *Mol. Microbiol.*, **70**, 1062-1075.
92. Meccas, J., Bilis, I., and Falkow, S. (2001) Identification of attenuated *Yersinia pseudotuberculosis* strains and characterization of an orogastric infection in BALB/c mice on day 5 postinfection by signature-tagged mutagenesis, *Infect. Immun.*, **69**, 2779-2787.
93. Wimberly, B. T., Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Morgan-Warren, R. J., Carter, A. P., Vornrhein, C., Hartsch, T., and Ramakrishnan, V. (2000) Structure of the 30S ribosomal subunit, *Nature*, **407**, 327-339.
94. Schuwirth, B. S., Day, J. M., Hau, C. W., Janssen, G. R., Dahlberg, A. E., Cate, J. H. D., and Vila-Sanjurjo, A. (2006) Structural analysis of kasugamycin inhibition of translation, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **13**, 879-886.
95. Demirci, H., Murphy, F. V., Murphy, E. L., Connetti, J. L., Dahlberg, A. E., Jogl, G., and Gregory, S. T. (2014) Structural analysis of base substitutions in *Thermus thermophilus* 16S rRNA conferring streptomycin resistance, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **58**, 4308-4317.
96. Nishimura, K., Hosaka, T., Tokuyama, S., Okamoto, S., and Ochi, K. (2007) Mutations in rsmG, encoding a 16S rRNA methyltransferase, result in low-level streptomycin resistance and antibiotic overproduction in *Streptomyces coelicolor* A3(2), *J. Bacteriol.*, **189**, 3876-3883.
97. Okamoto, S., Tamaru, A., Nakajima, C., Nishimura, K., Tanaka, Y., Tokuyama, S., Suzuki, Y., and Ochi, K. (2007) Loss of a conserved 7-methylguanosine modification in 16S rRNA confers low-level streptomycin resistance in bacteria, *Mol. Microbiol.*, **63**, 1096-1106.
98. Mikheil, D. M., Shippy, D. C., Eakley, N. M., Okwumabua, O. E., and Fadl, A. A. (2012) Deletion of gene encoding methyltransferase (gidB) confers high-level antimicrobial resistance in *Salmonella*, *J. Antibiot.*, **65**, 185-192.

99. Carter, A. P., Clemons, W. M., Brodersen, D. E., Morgan-Warren, R. J., Wimberly, B. T., and Ramakrishnan, V. (2000) Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics, *Nature*, **407**, 340-348.
100. Benítez-Páez, A., Cárdenas-Brito, S., Corredor, M., Villarroya, M., and Armengod, M. E. (2013) Mutaciones en genes modificadores de ARN ribosómico y la resistencia a aminoglucósidos: el caso del gen *rsmG*, *Biomédica*, **34**, 41, doi: 10.7705/biomedica.v34i0.1702.
101. Gustafsson, C., and Persson, B. C. (1998) Identification of the *rrmA* gene encoding the 23S rRNA m<sup>1</sup>G745 methyltransferase in *Escherichia coli* and characterization of an m<sup>1</sup>G745-deficient mutant, *J. Bacteriol.*, **180**, 359-365.
102. Jenner, L., Starosta, A. L., Terry, D. S., Mikolajka, A., Filonava, L., Yusupov, M., Blanchard, S. C., Wilson, D. N., and Yusupova, G. (2013) Structural basis for potent inhibitory activity of the antibiotic tigecycline during protein synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **110**, 3812-3816.
103. Lupien, A., Gingras, H., Leprohon, P., and Ouellette, M. (2015) Induced tigecycline resistance in *Streptococcus pneumoniae* mutants reveals mutations in ribosomal proteins and rRNA, *J. Antimicrob. Chemother.*, **70**, 2973-2980.
104. Nichols, R. J., Sen, S., Choo, Y. J., Beltrao, P., Zietek, M., et al. (2011) Phenotypic landscape of a bacterial cell, *Cell*, **144**, 143-156.

## rRNA METHYLATION AND ANTIBIOTIC RESISTANCE

### Review

I. A. Osterman<sup>1,2</sup>, O. A. Dontsova<sup>1,2,3</sup>, and P. V. Sergiev<sup>1,2,4\*</sup>

<sup>1</sup> Center of Life Sciences, Skolkovo Institute of Science and Technology, 143028 Skolkovo, Russia; E-mail: petya@genebee.msu.ru

<sup>2</sup> Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

<sup>3</sup> Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 117997 Moscow, Russia

<sup>4</sup> Institute of Functional Genomics, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

Received June 12, 2020

Revised July 16, 2020

Accepted July 16, 2020

Methylation of nucleotides in rRNA is one of the basic mechanisms of bacterial resistance to protein synthesis inhibitors. The genes for corresponding methyltransferases have been found in producer strains and clinical isolates of pathogenic bacteria. In some cases, rRNA methylation by housekeeping enzymes is, on the contrary, required for the action of antibiotics. The effects of rRNA modifications associated with antibiotic efficacy may be cooperative or mutually exclusive. Evolutionary relationships between the systems of rRNA modification by housekeeping enzymes and antibiotic resistance-related methyltransferases are of particular interest. In this review, we discuss the above topics in detail.

**Keywords:** ribosome, methylation, antibiotics, macrolides, aminoglycosides