

单颗粒冷冻电镜技术在核糖体抗生素耐药机理研究中的应用

王婧芬¹, 华孝挺², 张小东³, 吴航军⁴, 张 兴^{1,2,4*}, 俞云松^{2*}, 吴永平^{3*}

(1. 浙江大学基础医学院细胞生物学系, 浙江 杭州 310058; 2. 浙江大学医学院附属邵逸夫医院, 浙江 杭州 310058; 3. 浙江农林大学动物科技学院, 浙江 临安 311300; 4. 浙江大学冷冻电镜中心, 医学院附属邵逸夫医院电镜诊断中心, 浙江 杭州 310058)

摘 要 抗生素是现代医学的基础, 随着抗生素在临床上广泛长期应用, 细菌的耐药性日益显著, 已成为人类健康的威胁。核糖体负责翻译遗传信息合成细胞中的所有蛋白质, 是抗生素的主要靶点之一。本文从显微结构层次对核糖体抗生素的耐药性机理进行了总结, 论述了核糖体基因突变, 核糖体修饰及核糖体的保护机制导致细菌耐药性产生的分子机理, 展望了未来冷冻电镜显微技术在揭示核糖体抗生素耐药性机理研究中的作用和前景。

关键词 冷冻电镜; 抗生素; 细菌耐药性; 核糖体; 核糖体基因突变

中图分类号: R378; Q336 **文献标识码:** A **doi:** 10.3969/j.issn.1000-6281.2019.05.018

抗生素主要是由细菌, 真菌和放线菌等生成的次级代谢的天然产物, 用于抑制周围环境中其它竞争性的微生物。目前临床使用的抗生素有天然产物也有其派生物, 其中超过 50% 的抗生素靶点是针对细菌核糖体^[1]。抗生素在近代医学中发挥巨大作用, 显著延长了人类平均寿命^[2-3]。但由于抗生素的长期使用, 特别是滥用, 促进了许多耐药细菌的产生, 对人类健康造成了严重威胁^[4-5]: 每年欧洲有 25 000 人死于多重耐药病原菌引起的感染; 美国有不少于 200 万人感染抗药菌, 直接导致 23 000 人死亡, 因此急需发展针对耐药细菌的新型抗生素。高分辨显微结构对理解抗生素及耐药性的分子机理、对新型抗生素的设计改进至关重要。由于快速和高分辨的优点, 冷冻电镜显微技术在揭示抗生素及耐药性的分子机理、在基于结构信息的核糖体抗生素设计中将发挥重要作用。

1 核糖体与抗生素

核糖体是细胞内的一种超大分子复合体(分子量 2.5 ~ 4.5 MDa, 直径 25 ~ 30 nm), 负责读取 mRNA 的遗传信息来合成细胞的所有蛋白质, 对

种生命活动极其重要。除成熟红细胞外, 所有的活细胞中都有核糖体, 且数量巨大, 质量占细胞干重的 ~30%^[6]。核糖体主要有三种: 原核细胞核糖体为 70S, 真核细胞质核糖体为 80S 和真核细胞线粒体核糖体为 55 ~ 60S。因为核糖体对生命活动极其重要, 超过 50% 的抗生素选择性作用于核糖体, 通过干扰破坏蛋白合成来抑制细菌。细菌核糖体与抗生素的复合体高分辨结构可以为揭示细菌的耐药性机制和为新药开发提供关键结构信息(图 1, 图 2)。目前, 基于已经解析的细菌核糖体原子结构, 一些新抗生素已经被设计出来并进行临床实验, 例如 Radezolid、Eravacycline^[7-8]。病原细菌核糖体为 70S, 包括 30S 小亚基和 50S 大亚基两个部分, 都可与抗生素结合起到抑菌作用: 在 50S 亚基上, 抗生素可以作用于肽基转移酶中心、GTP 水解酶缔合中心、新生肽链通道, 或者通过掺入到延伸的肽链中来干扰蛋白质的合成^[9]; 在 30S 亚基上, 抗生素可以通过阻止核糖体起始复合体形成, 干扰 tRNA 结合, 干扰 tRNA 在翻译过程中的位点转移等机理来抑制蛋白质的合成^[10]。同时, 各种细菌也会进化出对应措施进行对抗, 从而产生对抗生素的抗药性。

收稿日期: 2019-08-06; 修订日期: 2019-08-27

基金项目: 中央高校基本科研业务费项目校长专项基金(No.2018XZZX001-13); 科技部重大专项(Nos.2018YFA0507700, 2017YFA0504803); 浙江省自然科学基金资助项目(No.LQ17C050001)。

作者简介: 王婧芬(1995-), 女(汉), 山西忻州, 硕士. E-mail: 21718587@zju.edu.cn

* 通讯作者: 张兴(1971-), 男(汉族), 贵州六盘水人, 教授, 博士研究生导师. E-mail: xzhang1999@zju.edu.cn;

俞云松(1965-), 男(汉族), 浙江衢州人, 博士, 教授, 博士研究生导师. E-mail: yuys119@zju.edu.cn;

吴永平(1979-), 女(汉族), 山东菏泽人, 博士, 副研究员, 硕士研究生导师. Email: wypzxd2002@163.com

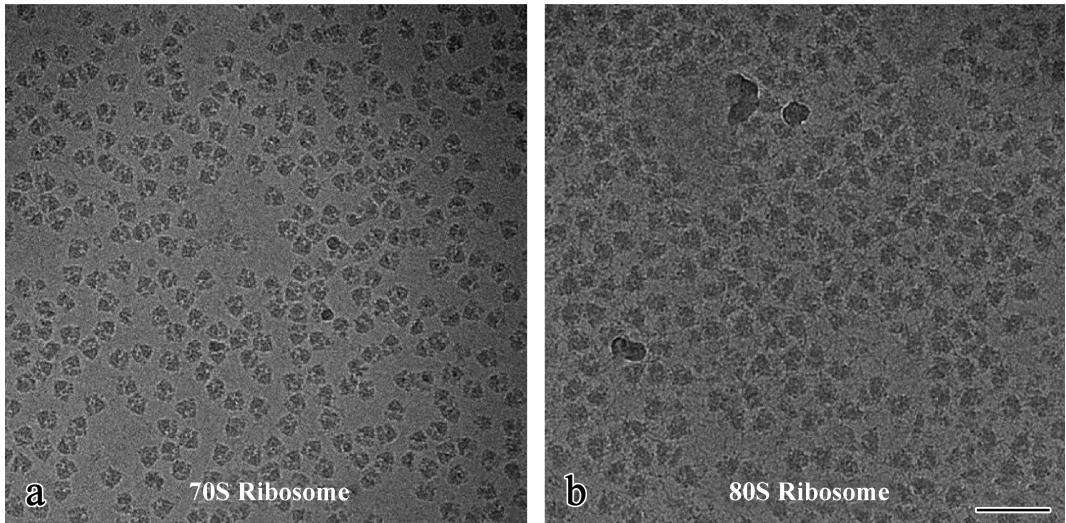


图1 核糖体冷冻电镜照片。a. 细菌 70S 核糖体;b. 人细胞质 80S 核糖体。Bar=50 nm

Fig. 1 Cryo-electron microscopy images of bacterial 70S Ribosomes (a) and human 80S Ribosomes (b).

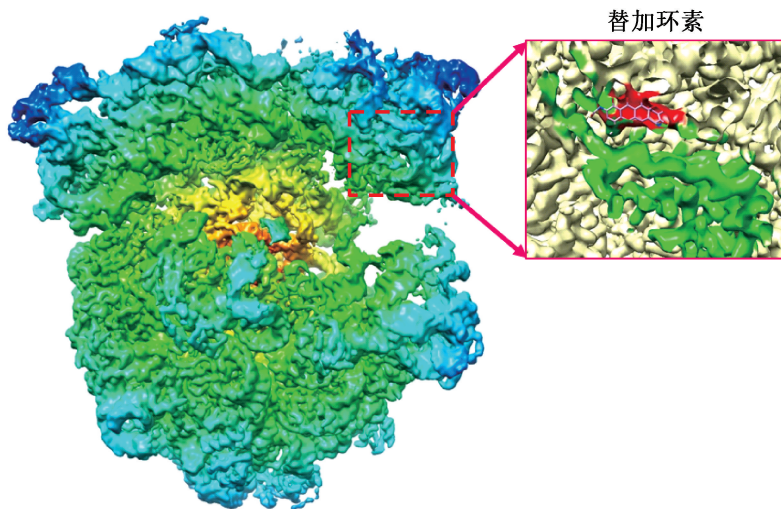


图2 替加环素与细菌核糖体复合物冷冻电镜结构。

Fig. 2 Cryo-electron microscopy structure of a bacterial ribosome with tigecycline.

2 细菌耐药性的产生

由于细菌不断的突变和进化,必然会产生耐药性,而抗生素的长期使用和滥用则大大提高了耐药性产生的频率^[11]。细菌耐药性分为固有耐药性和获得性耐药性。通常某种细菌会对某种特定的抗生素产生耐药性,称为固有耐药性。在一定条件下,某种细菌或者真菌通过产生次级代谢产物抗生素作用于其它微生物,其本身一定会具有抗性,这些内在抗性通常是源于产生这些抗生素的细菌中的抗性基因。内在抗性表现为细菌本身具有某种特有的结构或者某种特有的能力,在某种抗生素存在下可以正常生长增殖,最简单的原因是由于该抗

生素特异性靶点的缺失。随着大量且种类繁多的抗生素的长期广泛使用,有些细菌通过基因突变、转座子等方式获得了对多种抗生素的耐药性,并整合下来形成耐药菌。获得性耐药性可分为三类:(1)通过减少抗生素进入细胞或者通过外排泵的方式使得细胞内抗生素的总含量降低;(2)直接作用于抗生素,使其失活,比如水解或者修饰抗生素等;(3)改变抗生素作用的靶点,使得抗生素不能结合。大多数抗生素以高亲和力结合到靶点阻碍其正常功能,细菌通过突变改变靶点结构,阻碍抗生素的结合,从而产生耐药性。比起其它位点,多数抗生素是通过抑制细菌核糖体的蛋白合成功能,相应的耐药性产生机理包括核糖体基因突变,核糖体修饰

和核糖体保护蛋白等^[12]。

2.1 核糖体基因突变导致的耐药性

通过核糖体基因突变,改变核糖体与抗生素结合的亲和力,使得核糖体不再与抗生素结合,从而可以继续执行其正常功能。例如利奈唑胺是作用于革兰氏阳性菌核糖体核糖体 23S rRNA 的抗生素,其核糖体结合位点的基因突变后产生耐药性的肺炎链球菌和金黄色葡萄球菌^[2]。核糖体与抗生素的亲和力还可以通过基因突变影响非结合位点的蛋白结构来实现,例如在具有替加环素抗性的肺炎克雷伯菌核糖体中,与替加环素结合位点相邻的 S3 和 S10 蛋白的基因突变,会导致替加环素与 16S rRNA 的结合减弱,产生抗药性^[13-16]。

氨基糖苷类抗生素在核糖体 50S 和 30S 亚基上均有结合位点^[17-19],这类抗生素的耐药性也与核糖体基因突变有关。氨基糖苷类抗生素含有 2-脱氧链霉素(2-DOS),与核糖体 30S 核糖体 16S rRNA 上 mRNA 解码区域的螺旋 H44 作用,迫使 16S rRNA 的两个关键核苷酸 A1492 和 A1493 从螺旋中翻转出来^[20-21],导致核糖体翻译保真度的丢失,干扰蛋白质正常合成,最终导致细菌死亡^[22]。结核分枝杆菌对链霉素的耐药性的产生,是由于其 16S rRNA 编码基因 *rrs* 的突变,破坏了链霉素 2-DOS 与核糖体 16S rRNA 的相互作用,从而产生对链霉素的耐药性^[23-25]。

2.2 靶点修饰导致的耐药性

多种抗生素耐药性产生的机制与靶点的化学修饰相关,例如通过对抗生素结合位点的甲基化修饰,使抗生素不再与靶点结合,也是一种常见的耐药性形成机制^[26]。包括(1)大环内酯类抗生素耐药性的产生:红霉素核糖体甲基化酶通过对核糖体 16S rRNA 的甲基化修饰,改造了红霉素结合位点,阻止了大环内酯类抗生素的结合,产生耐药性^[26]; (2)氨基糖苷类抗生素耐药性,也是通过同样的分子机理,例如阿米卡星、妥布霉素和庆大霉素等^[27-28]。这些甲基转移酶对 16S rRNA 中核苷酸 G1405 的 N7 位进行甲基化,产生了对 4,6-二取代氨基糖苷类抗生素和妥布霉素的耐药性^[29];对核苷酸 A1408 的 N1 位的甲基化,则导致了对另一种 4,5-二取代氨基糖苷类抗生素和对安普霉素的耐药性^[29]; (3)甲基化还可以发生在 23S rRNA 上,例如已经发现的氯霉素-氟苯尼考甲基转移酶,可以特异性的甲基化 23S rRNA 上的 A2503,从而对多种抗生素产生耐药性^[30]。核糖体 rRNA 甲基转移酶结

构相似,分为内源性和外源性两种。目前在临床菌株中已鉴定了多个核糖体 16S rRNA 甲基转移酶,包括 *rmtA*^[31]、*rmtB*^[32]、*rmtC*^[33]、*rmtD*^[34] 和 *rmtE*^[35] 等。内源性甲基转移酶则是细菌内部的甲基化酶,用来避免其核糖体被自身产生的氨基糖苷类抗生素所抑制,例如大肠埃希菌中发现的内源性的甲基化酶^[36];外源性甲基转移酶很可能来源于内源性甲基化酶,由质粒所介导,其耐药性可以进行传播和扩散。

2.3 核糖体保护蛋白介导的耐药性

核糖体保护由核糖体保护蛋白所介导,这些胞质蛋白质能导致细菌对四环素、强力霉素、米诺环素等的抗性,其中最具有代表性的是 TetO 和 TetM^[37]。核糖体保护蛋白 TetO 和 TetM 具有核糖体依赖性的 GTP 酶活性,与核糖体延伸因子 EF-Tu,EF-G 等具有同源性^[38-41]。这些核糖体保护蛋白通过结合到被四环素抑制的核糖体,促使四环素从核糖体上解离,恢复核糖体的正常功能^[42]。通过改变抗生素分子结构,能克服核糖体保护蛋白所介导的保护机制,例如第三代四环素衍生物替加环素等^[43-44]。另外一类核糖体保护蛋白—ABC-F 蛋白,发现于链球菌、肠球菌和葡萄状球菌等细菌中,能产生更广泛的抗生素耐药性。这类核糖体保护蛋白结合于核糖体上,通过变构效应引起抗生素结合部位的结构变化,导致抗生素解离、恢复核糖体功能和产生耐药性^[45-47]。

3 冷冻电镜在核糖体抗生素耐药性机理研究中的应用

单颗粒冷冻电镜技术包括了冷冻样品制备、电镜数据收集和图像处理三维重构。经过多年发展完善,单颗粒冷冻电镜技术于 2008~2010 年首次成功解析了生物大分子复合体的原子结构,标志着单颗粒冷冻电镜技术正式进入了原子分辨率时代,成为研究生物大分子结构与功能的重要工具^[48-50]。单颗粒冷冻电镜技术,由于快速、无需晶体、能解析动态和非稳定结构的优点,非常适合用来解析超大分子分子量的核糖体结构,揭示其结构和功能关系、阐明抗生素和耐药性的分子机理(图 1,图 2)。

在抗生素的作用机理研究中,Arenz 等^[51]利用冷冻电镜获得了依维米星和卑霉素与大肠杆菌的核糖体复合体高分辨结构,揭示依维米星和卑霉素结合到核糖体大亚基上的一个独特位点,与核糖体 23S rRNA 的 H89 和 H91 小沟、与 tRNA 结合位点 A

的蛋白 L16 精氨酸等残基相互作用,发挥抑制作用。同时,依维米星和卑霉素会保护核糖体多个核苷酸不被硫酸二甲酯(DMS)修饰,在核糖体组装过程中干扰正常核糖体的形成。在红霉素与核糖体的作用机理研究中^[52],冷冻电镜技术解析了红霉素依赖性的 ErmCL 停滞的核糖体结构,揭示了 ErmCL 新生肽链通过感应核糖体抗生素的结合、引起核糖体肽基转移酶中心的构象变化,导致 A 位点 tRNA 不能稳定结合而被释放、从而终止了翻译过程。此外,在抗生素耐药性的作用机理研究中^[53],Arenz 等^[51]利用冷冻电镜研究核糖体耐药性中的核糖体保护蛋白介导的核糖体保护机制。通过解析四环素抗性蛋白 TetM 与核糖体复合体的 3.9 Å 结构,揭示了 TetM 的结构域 IV 中的氨基酸残基 Pro509 与 16S rRNA 的核苷酸 C1054 相互作用,将促使四环素从核糖体解离、恢复核糖体正常功能。

综上所述,核糖体作为抗生素的重要靶标,对基础医学和药理学都具有重要的意义。单颗粒冷冻电镜显微技术,由于其快速、高分辨和能解析动态结构的优点,将在揭示核糖体抗生素及耐药性的分子机理、以及药物设计中发挥越来越重要的作用。

参考文献:

- [1] KATZ L, BALTZ R H. Natural product discovery: past, present, and future [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2016, 43 (2/3): 155-176.
- [2] BLAIR J M A, WEBBER M A, BAYLAY A J, et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13 (1): 42-51.
- [3] 王秀倩. 抗生素耐药性分子机制研究进展 [J]. *口岸卫生控制*, 2018, 23 (3): 24-31.
- [4] XIONG W G, SUN Y X, ZHANG T, et al. Antibiotics, antibiotic resistance genes, and bacterial community composition in fresh water aquaculture environment in China [J]. *Microbial Ecology*, 2015, 70 (2): 425-432.
- [5] 郑璇, 郑育洪. 国内外超级细菌的研究进展及防控措施 [J]. *中国畜牧兽医文摘*, 2012 (1): 69-75.
- [6] MILO R, PHILLIPS R. *Cell biology by the numbers* [M]. Garland Science, 2015.
- [7] WILSON D N. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12 (1): 35-48.
- [8] FAIR R J, TOR Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century [J]. *Perspectives in Medicinal Chemistry*, 2014, 6: 25-64.
- [9] WILSON D N. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12 (1): 35-48.
- [10] WILSON D N. The A-Z of bacterial translation inhibitors [J]. *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, 2009, 44 (6): 393-433.
- [11] WENCEWICZ T A. Crossroads of antibiotic resistance and biosynthesis [J]. *J Mol Biol*, 2019, 431 (18): 3370-3399.
- [12] MAXWELL A, DOWSON C G, SPENCER J. The molecular basis of antibiotic action and resistance [J]. *J Mol Biol*, 2019, 431 (18): 3367-3369.
- [13] VILLA L, FEUDI C, FORTINI D, et al. Genomics of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 512 clone highlights the role of RamR and ribosomal S10 protein mutations in conferring tigecycline resistance [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58 (3): 1707-1712.
- [14] BEABOUT K, HAMMERSTROM T G, PEREZ A M, et al. The ribosomal S10 protein is a general target for decreased tigecycline susceptibility [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59 (9): 5561-5566.
- [15] FANG L, CHEN Q, SHI K, et al. Step-Wise Increase in Tigecycline Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Associated with Mutations in ramR, lon and rpsJ [J]. *PLoS One*, 2016, 11 (10): e0165019.
- [16] LUPIEN A, GINGRAS H, LEPROHON P, et al. Induced tigecycline resistance in *Streptococcus pneumoniae* mutants reveals mutations in ribosomal proteins and rRNA [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2015, 70 (11): 2973-2980.
- [17] ZHOU J, LANCASTER L, DONOHUE J P, et al. How the ribosome hands the A-site tRNA to the P site during EF-G-catalyzed translocation [J]. *Science*, 2014, 345 (6201): 1188-1191.
- [18] FELDMAN M B, TERRY D S, ALTMAN R B, et al. Aminoglycoside activity observed on single pre-translocation ribosome complexes [J]. *Nat Chem Biol*, 2010, 6 (1): 54-62.
- [19] WASSERMAN M R, PULK A, ZHOU Z, et al. Chemically related 4,5-linked aminoglycoside antibiotics drive subunit rotation in opposite directions [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 7896.
- [20] SHANDRICK S, ZHAO Q, HAN Q, et al. Monitoring molecular recognition of the ribosomal decoding site [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2004, 43 (24): 3177-82.
- [21] VICENS Q, WESTHOF E. RNA as a drug target: the case of aminoglycosides [J]. *Chem Biochem*, 2003, 4 (10): 1018-1023.
- [22] GONZALEZ-ZORN B, TESHAGER T, CASAS M, et

- al. *armA* and aminoglycoside resistance in *Escherichia coli* [J]. *Emerg Infect Dis*, 2005, 11(6): 954–956.
- [23] MAGNET S, BLANCHARD J S. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance [J]. *Chem Rev*, 2005, 105(2): 477–498.
- [24] MAUS C E, PLIKAYTIS B B, SHINNICK T M. Molecular analysis of cross-resistance to capreomycin, kanamycin, amikacin, and viomycin in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(8): 3192–3197.
- [25] GEORGHIOU S B, MAGANA M, GARFEIN R S, et al. Evaluation of genetic mutations associated with *Mycobacterium tuberculosis* resistance to amikacin, kanamycin and capreomycin: a systematic review [J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e33275.
- [26] KUMAR N, RADHAKRISHNAN A, WRIGHT C C, et al. Crystal structure of the transcriptional regulator Rv1219c of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Protein Sci*, 2014, 23(4): 423–432.
- [27] CUNDLIFFE E. How antibiotic-producing organisms avoid suicide [J]. *Annu Rev Microbiol*, 1989, 43: 207–233.
- [28] WACHINO J, ARAKAWA Y. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update [J]. *Drug Resist Updat*, 2012, 15(3): 133–148.
- [29] LIOU G F, YOSHIZAWA S, COURVALIN P, et al. Aminoglycoside resistance by ArmA-mediated ribosomal 16S methylation in human bacterial pathogens [J]. *J Mol Biol*, 2006, 359(2): 358–364.
- [30] KEHRENBURG C, SCHWARZ S, JACOBSEN L, et al. A new mechanism for chloramphenicol, florfenicol and clindamycin resistance: methylation of 23S ribosomal RNA at A2503 [J]. *Molecular microbiology*, 2005, 57(4): 1064–1073.
- [31] YOKOYAMA K, DOI Y, YAMANE K, et al. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Lancet*, 2003, 362(9399): 1888–1893.
- [32] DOI Y, YOKOYAMA K, YAMANE K, et al. Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* conferring high-level resistance to aminoglycosides [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(2): 491–496.
- [33] WACHINO J, YAMANE K, KIMURA K, et al. Mode of transposition and expression of 16S rRNA methyltransferase gene *rmtC* accompanied by ISEcp1 [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50(9): 3212–3215.
- [34] DOI Y, GARCIA D O, ADAMS J, et al. Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo-beta-lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(3): 852–856.
- [35] DAVIS M A, BAKER K N, ORFE L H, et al. Discovery of a gene conferring multiple-aminoglycoside resistance in *Escherichia coli* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(6): 2666–2669.
- [36] GUTIERREZ B, DOUTHWAITE S, GONZALEZ-ZORN B. Indigenous and acquired modifications in the aminoglycoside binding sites of *Pseudomonas aeruginosa* rRNAs [J]. *RNA Biol*, 2013, 10(8): 1324–1332.
- [37] CONNELL S R, TRACZ D M, NIERHAUS K H, et al. Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47(12): 3675–3681.
- [38] SANCHEZ-PESCADOR R, BROWN J T, ROBERTS M, et al. Homology of the TetM with translational elongation factors: implications for potential modes of tetM-conferred tetracycline resistance [J]. *Nucleic Acids Res*, 1988, 16(3): 1218.
- [39] TAYLOR D E, CHAU A. Tetracycline resistance mediated by ribosomal protection [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996, 40(1): 1–5.
- [40] NOAH J W, DOLAN M A, BABIN P, et al. Effects of tetracycline and spectinomycin on the tertiary structure of ribosomal RNA in the *Escherichia coli* 30S ribosomal subunit [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(23): 16576–81.
- [41] TRIEBER C A, BURKHARDT N, NIERHAUS K H, et al. Ribosomal protection from tetracycline mediated by Tet(O): Tet(O) interaction with ribosomes is GTP-dependent [J]. *Biol Chem*, 1998, 379(7): 847–855.
- [42] JENNER L, STAROSTA A L, TERRY D S, et al. Structural basis for potent inhibitory activity of the antibiotic tigecycline during protein synthesis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(10): 3812–3816.
- [43] BERGERON J, AMMIRATI M, DANLEY D, et al. Glycylcyclines bind to the high-affinity tetracycline ribosomal binding site and evade Tet(M)- and Tet(O)-mediated ribosomal protection [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996, 40(9): 2226–2228.
- [44] GROSSMAN T H, STAROSTA A L, FYFE C, et al. Target- and resistance-based mechanistic studies with TP-434, a novel fluorocycline antibiotic [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56(5): 2559–2564.
- [45] SHARKEY L K, EDWARDS T A, O'NEILL A J. ABC-F proteins mediate antibiotic resistance through ribosomal protection [J]. *mBio*, 2016, 7(2): e01975.

- [46] KERR I D. Sequence analysis of twin ATP binding cassette proteins involved in translational control, antibiotic resistance, and ribonuclease L inhibition[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 315(1): 166–173.
- [47] CROWE-MCAULIFFE C, GRAF M, HUTER P, et al. Structural basis for antibiotic resistance mediated by the *Bacillus subtilis* ABCF ATPase VmlR [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(36): 8978–8983.
- [48] ZHANG X, JIN L, FANG Q, et al. 3.3 Å cryo-EM structure of a nonenveloped virus reveals a priming mechanism for cell entry[J]. *Cell*, 2010, 141(3): 472–482.
- [49] YU X, JIN L, ZHOU Z H. 3.88 Å structure of cytoplasmic polyhedrosis virus by cryo-electron microscopy[J]. *Nature*, 2008, 453(7193): 415–419.
- [50] ZHANG X, SETTEMBRE E, XU C, et al. Near-atomic resolution using electron cryomicroscopy and single-particle reconstruction[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(6): 1867–1872.
- [51] ARENZ S, JUETTE M F, GRAF M, et al. Structures of the orthosomycin antibiotics avilamycin and evermimicin in complex with the bacterial 70S ribosome [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(27): 7527–32.
- [52] ARENZ S, MEYDAN S, STAROSTA A L, et al. Drug sensing by the ribosome induces translational arrest via active site perturbation[J]. *Molecular Cell*, 2014, 56(3): 446–452.
- [53] ARENZ S, NGUYEN F, BECKMANN R, et al. Cryo-EM structure of the tetracycline resistance protein TetM in complex with a translating ribosome at 3.9-Å resolution [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015, 112(17): 5401–5406.

Prospect of single-particle cryo-electron microscopy in revealing mechanisms of ribosomal antibiotics resistance

WANG Jing-Fen¹, HUA Xiao-ting², ZHANG Xiao-dong³, WU Hang-jun⁴,
ZHANG Xing^{1,2,4*}, YU Yun-song^{2*}, WU Yong-ping^{3*}

1. Department of Cell Biology, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou Zhejiang 310058;
2. Sir Run Run Shaw Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou Zhejiang 310058;
3. College of Animal Science and Technology, Zhejiang A&F University, Linan Zhejiang 311300;
4. Center of Cryo-Electron Macroscopy, Zhejiang University, Hangzhou Zhejiang 310058, China)

Abstract Antibiotics are the foundation of modern medicine, but with the widespread use of antibiotics in clinical practice, bacterial resistance has increasingly become prominent and a global health problem. Ribosome synthesizes proteins using genetic information, and is one of the main targets of antibiotics. This paper summarizes the structural bases of ribosomal antibiotics resistance, discusses the molecular mechanisms of ribosomal gene mutation, modification and protection that lead to bacterial resistance, and looks forward to the roles and prospects of single-particle cryo-electron microscopy (cryo-EM) in further revealing mechanisms of ribosomal antibiotics resistance.

Keywords cryo-electron microscopy (cryo-EM); antibiotics; antibiotic resistance; ribosome; mutations of ribosome