



Doctoral Thesis

Genetische und physiologische Untersuchungen an femD-Mutanten in Methicillin-resistenten Staphylococcus aureus

Author(s):

Glanzmann, Philipp Johann

Publication Date:

1999

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-003825062> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

**Genetische und physiologische
Untersuchungen an *femD*-Mutanten
in Methicillin-resistenten
*Staphylococcus aureus***

**ABHANDLUNG
zur Erlangung des Titels
DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN
der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE
ZÜRICH**

**vorgelegt von
PHILIPP JOHANN GLANZMANN
Dipl. Natw. ETH
geboren am 6. Mai 1969
von Luzern**

**Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. M. Teuber, Referent
Prof. Dr. B. Berger-Bächi, Korreferentin**

1999

Zusammenfassung

Die Methicillin-Resistenz in *Staphylococcus aureus* wird durch ein zusätzliches Penicillin-bindendes Protein, das PBP2' (PBP2a), vermittelt. Dieses PBP2' übernimmt die Transpeptidase-Funktion der anderen vier PBP, wenn diese durch hohe β -Laktam Konzentrationen inaktiviert werden. Dieses zusätzlich PBP2' wird nur in Methicillin-resistenten *S. aureus* Stämmen (MRSA) gefunden und wird durch das Strukturgen *mecA* kodiert, das sich auf der *mec* Determinante befindet. Eine charakteristische Eigenschaft der *mec*-bedingten Resistenz ist deren heterogene Expression, d.h. die meisten Zellen einer MRSA Population exprimieren eine niedrige Basisresistenz, während einige wenige Zellen hochresistent sind.

Neben PBP2' gibt es eine grosse Zahl chromosomaler Faktoren, die die Methicillin-Resistenz beeinflussen. Diese Faktoren wurden mittels Transposon-Insertionsinaktivierung mit Tn551 identifiziert und werden *fem* Faktoren (factors essential for methicillin resistance) genannt. Im Gegensatz zur *mec* Determinante kommen die *fem* Faktoren auch in Methicillin-empfindlichen *S. aureus* Stämmen (MSSA) vor. Diese Faktoren sind direkt oder indirekt in den Peptidoglykan-Metabolismus involviert und ihre Inaktivierung reduziert die Methicillin-Resistenz. Einer dieser Faktoren ist das *glmM*, welches für eine Phosphoglukosamin Mutase GlmM kodiert und ursprünglich als *femD* bezeichnet wurde. Seine Inaktivierung führt zu einer generell erhöhten Empfindlichkeit gegenüber β -Laktamen, unabhängig davon ob es sich um einen MRSA oder einen MSSA handelt. Weiter resultierte die *glmM* Inaktivierung in einer Teicoplanin-Hyperempfindlichkeit. Trotz dieser erhöhten Empfindlichkeit gegen β -Laktame und Teicoplanin wurde die PBP2' Produktion nicht beeinflusst. *glmM* ist Teil eines dreizustronischen Operons *orf1-orf2-glmM*. Distal von *orf1*, als auch vor *glmM* konnte ein Transkriptionsstart identifiziert werden, was zu einem dreizustronischen und einem monozustronischen Transkript führte.

Komplementation der *glmM*-Mutation mit dem ganzen *glmM*-Operon stellte sowohl die Methicillin-Resistenz als auch die ursprüngliche Teicoplanin-Empfindlichkeit wieder her. Wurde hingegen nur mit *glmM* komplementiert, so konnte zwar die Methicillin-Resistenz wieder hergestellt werden, die Teicoplanin-Hyperempfindlichkeit blieb jedoch bestehen.

Aus *glmM*-Mutanten konnten hoch Methicillin-resistente Suppressor-Mutanten durch Wachstum auf Methicillin selektioniert werden. Eine dieser Suppressor Mutanten wurde genauer charakterisiert. Sie produzierte wie die Methicillin-empfindlich gewordenen *glmM*-Mutanten keine Phosphoglukosamin-Mutase mehr und war ebenfalls Teicoplanin hyperempfindlich. Die Suppressor-Mutation war nicht mit der *glmM*-Mutation transduzierbar, korrelierte mit einer erniedrigten spontanen Autolyse und zeigte eine erhöhte Produktion eines 49 kDa grossen Proteins. Daraus wurde geschlossen, dass es in *S. aureus* einen alternativen Weg für die Glukosamin-1-Phosphat Synthese geben muss.

Abstract

Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* is due to the additional penicillin-binding protein, PBP2' (PBP2a), which has a lower affinity for methicillin than the endogenous four PBPs. PBP2' is encoded by the structural gene *mecA*, has in vitro transpeptidase activity and is thought to substitute for the functions of the PBPs when they are inactivated by high concentrations of β -lactams. Methicillin resistance levels are strain-specific and may vary from very low to high values. Characteristic for methicillin-resistant *S. aureus* is the heterogeneous expression of the resistance with the production of a subpopulation of cells highly resistant to methicillin.

Besides *mecA*, there is a large number of chromosomal genes, initially called *fem* factors, which are known to influence methicillin resistance levels. These genes are involved, directly or indirectly, in peptidoglycan metabolism. Any mutations that alter peptidoglycan precursor composition and/or -formation reduce methicillin resistance. The phosphoglucosamine mutase GlmM, initially identified as *femD* mutation catalyses the conversion of glucosamine-6-phosphate to glucosamine-1-phosphate, which is an early cytoplasmatic step in peptidoglycan biosynthesis.

glmM was shown to be the last gene of a three-cistronic operon *orf1-orf2-glmM*. One transcriptional start was identified upstream of *orf1*, and a second transcriptional start producing a mono-cistronic transcript, upstream of *glmM*. Disruption of *glmM* abolished GlmM production, decreased methicillin resistance, and resulted in teicoplanin hypersusceptibility, without affecting the production of the endogenous penicillin-binding proteins and PBP2'. Complementation of the *glmM* mutation by the complete *glmM* operon restored both methicillin resistance and normal teicoplanin susceptibility. In contrast, complementation with *glmM* only restored the methicillin resistance, but the teicoplanin susceptibility remained low.

A highly methicillin-resistant suppressor mutant obtained by selection for growth in presence of methicillin remained GlmM deficient and teicoplanin

hypersusceptible. The inactivation of *glmM* can be overcome by a suppressor mutation leading to high level methicillin resistance. The suppressor mutation was not linked to the *glmM* operon and correlated with decreased autolysis and increased production of a 49 kDa protein suggesting that there is an alternative pathway for glucosamine-1-phosphate synthesis in *S. aureus*.