

Der Citronellolstoffwechsel in
Pseudomonaden – Funktionelle Zuordnung
beteiligter Gene und deren Produkte

Von der Fakultät für Energie-, Verfahrens- und Biotechnik der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

vorgelegt von

Karin Förster-Fromme

aus Ludwigsburg

Hauptberichter: Prof. Dr. Dieter Jendrossek

Mitberichter: Prof. Dr. Arnd Heyer

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Februar 2008

Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart

2008

Die experimentellen Arbeiten für die vorliegende Dissertation wurden unter der Leitung von Prof. Dr. D. Jendrossek am Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungen	5
Abstract	6
Zusammenfassung	8
1 Einleitung.....	10
1.1 Vorkommen und Wirkung von Terpenen.....	10
1.2 Abbau von Terpenoiden	11
1.3 Ziele dieser Arbeit.....	14
2 Der Citronellolstoffwechsel in <i>P. citronellolis</i> und <i>P. aeruginosa</i> PAO1	16
2.1 Die zum Citronellolabbau befähigten Pseudomonaden.....	16
2.2 Die in den Citronellolabbau involvierten Gene.....	17
2.2.1 Das <i>atu</i> (acyclic terpene utilisation)- und das <i>liu</i> (leucine/isovalerate utilisation)-Gencluster	17
2.2.2 Weitere in den Citronellolabbau involvierte Gene	21
2.3 Die Oxidation der Terpenalkohole zu den Terpensäuren	24
2.3.1 Die NAD ⁺ - und NADP ⁺ -abhängige Oxidation der Terpenalkohole und Terpenaldehyde	25
2.3.2 Die Rolle der Quinon-Alkoholdehydrogenase, PA1982, bei der Oxidation der Terpenalkohole und -aldehyde.....	27
2.4 Die Aktivierung der Citronellsäure als CoA-Thioester und die Einführung einer Doppelbindung	29
2.5 Die Carboxylierung von Geranyl-CoA und die darauffolgende Hydratisierung.....	33
2.6 Die Abspaltung von Acetat durch die 3-Hydroxy-3-isohexenyl-glutaryl-CoA:acetat-Lyase	34
2.7 Die β -Oxidation.....	35
2.8 Der Übergang in den Leucinstoffwechsel	37

2.9	Der weitere Abbau der Endprodukte des Atu- und Liu-Stoffwechsels – der Übergang in den Glyoxylatstoffwechsel.....	41
2.10	Die Regulation des Citronellolstoffwechsels.....	43
2.11	Ausblick	47
3	Literaturverzeichnis	50
	Anhang 1: Malate:quinone oxidoreductase (MqoB) is required for growth on acetate and linear terpenes in <i>Pseudomonas citronellolis</i>	55
	Anhang 2: Identification of genes and proteins necessary for catabolism of acyclic terpenes and leucine/isovalerate in <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	62
	Anhang 3: Identification and characterization of the acyclic terpene utilization gene cluster of <i>Pseudomonas citronellolis</i>	72
	Anhang 4: Biochemical characterization of AtuD from <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , the first member of a new subgroup of acyl-CoA-dehydrogenases with specificity for citronellyl-CoA	78
	Anhang 5	87
	Danksagungen	89
	Lebenslauf.....	90

Abkürzungen

C	Citronellol
Ci	Citronellal
CoA	Coenzym A
CS	Citronellsäure
DCPIP	2,6-Dichlorphenolindophenol
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
G	Geraniol
GCase	Geranyl-CoA-Carboxylase
Ge	Geranial
Glu.	Glucose
GS	Geranylsäure
IV	Isovaleriansäure
MCase	Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase
MQO	Malat:Quinon Oxidoreduktase
PQQ	Pyrrroloquinolin-Quinon
Suc	Succinat
U	Unit (μmol umgesetztes Substrat /min)
WT	Wildtyp

Abstract

Citronellol and geraniol are widespread scents with acyclic terpenoid molecule structures in nature. Because of their β -methyl-branched carbon skeleton they can not be degraded via β -oxidation. Recently two gene clusters involved in the citronellol degradation pathway could be identified in *P. aeruginosa* PAO1, the *atu* (acyclic terpene utilisation)- and the *liu* (leucine/isovalerate utilisation)-gene cluster (FÖRSTER-FROMME ET AL., 2006, HÖSCHLE ET AL., 2005). Up to now only genes coding the carboxylases involved in the citronellol degradation pathway could be identified (HÖSCHLE ET AL., 2005). In the present work several other genes of the gene clusters were functionally assigned.

- A gene cluster (*atuRABCDEFGH*) was identified and sequenced in *P. citronellolis*; the genes showed very high similarities to the *atu*-genes of *P. aeruginosa* PAO1. An insertion mutant in *atuA* was unable to utilise acyclic terpenes and indicated that this gene is essential for citronellol degradation.
- Investigation of two *P. citronellolis* transposon mutants in *mgoB* showed that the malate:quinone oxidoreductase (MQO) plays an essential role in the degradation of terpenoids. The end products of the citronellol degradation pathway enter the glyoxylate cycle and MQO is an essential enzyme of this pathway.
- In *P. aeruginosa* PAO1 the function of the citronellyl-CoA-dehydrogenase was assigned to *AtuD*. *AtuD* was expressed, purified and a specific activity of 850 ± 37 mU/mg for citronellyl-CoA was determined. The K_M value for citronellyl-CoA is $1,6 \pm 0,3$ μ M. The reaction product geranyl-CoA was identified by mass spectrometry. *AtuD* is highly specific for citronellyl-CoA while it is inactive with isovaleryl-CoA and octanoyl-CoA.

2D-gel-analysis showed that an additional acyl-CoA-dehydrogenase was expressed specifically during growth on terpenoids and it was identified as PA1535 gene product. The PA1535 gene product was expressed in *E. coli*, purified and its substrate specificity was determined. The enzyme converted citronellyl-CoA with 2450 ± 26 mU/mg (K_M value $18 \pm 1,1$ μ M) and octanoyl-CoA

with 610 ± 10 mU/mg (K_M value $130 \pm 9,8$ μ M). The enzyme was inactive with isovaleryl-CoA.

- The function of the isovaleryl-CoA-dehydrogenase was assigned to LiuA in *P. aeruginosa* PAO1. LiuA was expressed and converts isovaleryl-CoA with 1620 ± 55 mU/mg (K_M value $2,3 \pm 0,4$ μ M). LiuA was inactive with long chain acyl-CoA thioesters like citronellyl-CoA or octanoyl-CoA.
- The gene upstream of the *atu*-gene cluster (PA2885) was identified as the repressor of the *atu*-gene cluster (AtuR) in *P. aeruginosa* PAO1. AtuR is a member of the TetR family. An area with similarities to σ -70 promoters and partial overlapping two perfect inverted repeats was identified in the intergenic region between *atuR* and *atuA* (280 bp). Heterologously expressed and purified AtuR_{His6} was able to bind specifically to the intergenic region in gel shift experiments. Both inverted repeats but not the -10 and the -35-region were necessary for complete binding. Citronellol, geraniol, citronellal, geranial, citronellate and geranylate but not leucine, isovaleric acid, 3-methylcrotonic acid, phytol and eucalyptol prevented AtuR from binding and apparently represent the effectors of AtuR.
- Proteom analysis showed that six of eight *Atu*-proteins and four of five *Liu*-proteins were specifically expressed during growth on acyclic terpenes and isovalerate, respectively. Furthermore 16 additional proteins were identified which are supposed to be involved in the citronellol degradation pathway.
- All *atu*-genes of the *atu*-gene cluster were inactivated by insertion of pKnockout-G (WINDGASSEN ET AL., 2000) into the genes in *P. aeruginosa* PAO1. Five of them (*atuA*, *atuB*, *atuC*, *atuD*, *atuF*) turned out to be essential for citronellol utilisation. Insertion in *atuE*, *atuG* and *atuH* showed no phenotype.

Zusammenfassung

Citronellol und Geraniol sind in der Natur als Duftstoffe weit verbreitete azyklische Terpenoide, die aufgrund ihrer β -ständigen Methylgruppe nicht über β -Oxidation abgebaut werden können. In jüngster Zeit konnten zwei in den Citronellolabbau involvierte Gencluster in *P. aeruginosa* PAO1 identifiziert werden, das *atu* (acyctic terpene utlisation)- und das *liu* (leucine/isovalerate utlisation)-Gencluster (FÖRSTER-FROMME ET AL., 2006, HÖSCHLE ET AL., 2005). Bisher konnten nur die Gene der in den Citronellolstoffwechsel involvierten Carboxylasen funktionell identifiziert werden (HÖSCHLE ET AL., 2005). In dieser Arbeit wurden weitere Gene der Cluster funktionell zugeordnet.

- In *P. citronellolis* wurde ein Gencluster (*atuABCDEFGH*) identifiziert und sequenziert, dessen Gene sehr hohe Identitäten zu den *atu*-Genen von *P. aeruginosa* PAO1 aufwiesen. Dieses Gencluster wurde als *atu*-Gencluster von *P. citronellolis* annotiert. Eine Insertionmutante in *atuA* zeigte, daß dieses Gen essentiell für den Citronellolabbau ist.
- In *P. citronellolis* konnte anhand zweier Transposonmutanten in *mqoB* gezeigt werden, daß die Malat-Quinon-Oxidoreduktase (MqoB) eine essentielle Rolle beim Abbau von Terpenoiden spielt, da die Endprodukte des Citronellolabbaus in den Glyoxylatstoffwechsel eingehen und die Malat-Quinon-Oxidoreduktase ein essentielles Enzym dieses Stoffwechselweges ist.
- In *P. aeruginosa* PAO1 konnte die Funktion der Citronellyl-CoA-Dehydrogenase *AtuD* zugeordnet werden. *AtuD* wurde exprimiert und gereinigt und eine spezifische Aktivität von 850 ± 37 mU/mg für den Umsatz von Citronellyl-CoA ermittelt. Der K_M -Wert für Citronellyl-CoA beträgt $1,6 \pm 0,3$ μ M. Das Reaktionsprodukt Geranyl-CoA wurde mit HPLC und Massenspektrometrie nachgewiesen. *AtuD* ist hochspezifisch für Citronellyl-CoA, da Isovaleryl-CoA oder Octanoyl-CoA nicht umgesetzt werden.

Durch 2D-Gelanalysen wurde eine weitere Acyl-CoA-Dehydrogenase als spezifisch beim Wachstum auf Terpenoiden erkannt und als PA1535-Genprodukt identifiziert. Das PA1535-Genprodukt wurde heterolog in *E. coli* exprimiert,

gereinigt und die Substratspezifität bestimmt. Das Enzym setzte Citronellyl-CoA mit 2450 ± 26 mU/mg (K_M -Wert $18 \pm 1,1$ μ M) und Octanoyl-CoA mit 610 ± 10 mU/mg (K_M -Wert $130 \pm 9,8$ μ M) um. Isovaleryl-CoA stellt kein geeignetes Substrat dar.

- In *P. aeruginosa* PAO1 wurde die Funktion der Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase LiuA zugeordnet. Gereinigtes LiuA setzte Isovaleryl-CoA mit 1620 ± 55 mU/mg (K_M -Wert $2,3 \pm 0,4$ μ M) um. Langkettige CoA-Thioester wie Citronellyl-CoA oder Octanoyl-CoA wurden nicht umgesetzt.
- In *P. aeruginosa* PAO1 wurde das stromaufwärts des *atu*-Genclusters liegende Gen (PA2885) durch Insertionsmutagenese als Repressor des *atu*-Genclusters identifiziert (*atuR*). *AtuR* gehört zur TetR-Familie. In dem intergenischen Bereich zwischen *atuR* und *atuA* (280 bp) wurde eine Region mit Ähnlichkeit zu σ -70 Promotoren sowie partiell überlappend zwei perfekte inverted repeats gefunden. Heterolog exprimiertes und gereinigtes *AtuR*_{His6} war in der Lage, in Gelshift-Experimenten spezifisch an den intergenischen Bereich zu binden. Für eine vollständige Bindung waren beide inverted repeats, nicht aber die -10- und die -35-Region notwendig. Citronellole, Geraniol, Citronellal, Geranial, Citronellsäure und Geranylensäure, nicht aber Leucin, Isovaleriansäure, 3-Methylcrotonsäure, Phytol und Eukalyptol verhinderten die Bindung von *AtuR* und stellen somit offenbar Effektoren von *AtuR* dar.
- Mithilfe von Proteomanalysen wurde gezeigt, daß sechs von acht *Atu*-Proteinen und vier von fünf *Liu*-Proteinen spezifisch beim Wachstum auf azyklischen Terpenen, bzw. Isovalerat gebildet werden. Des Weiteren wurden 16 weitere Proteine identifiziert, die vermutlich ebenfalls am Citronellolestoffwechsel beteiligt sind.
- Bei *P. aeruginosa* POA1 wurden alle Gene des *atu*-Genclusters durch Insertion von pKnockout-G (WINDGASSEN ET AL., 2000) inaktiviert. Es wurde gezeigt, daß fünf der *atu*-Gene (*atuA*, *atuB*, *atuC*, *atuD*, *atuF*) essentiell für den Citronelloleabbau waren. Insertionsmutanten in *atuE*, *atuG* und *atuH* zeigten keinen Phänotyp.

1 Einleitung

1.1 Vorkommen und Wirkung von Terpenen

Terpene sind in der Natur weit verbreitet. Sie kommen vor allem in Pflanzen als Bestandteile der ätherischen Öle vor, sind aber auch oft als Pheromone bei Insekten zu finden. Viele Terpene sind reine Kohlenwasserstoffe, man findet jedoch auch sauerstoffhaltige Verbindungen wie Alkohole, Aldehyde und Ketone (Terpenoide). Ihr Grundbaustein ist das Isopren, $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$. Sie werden nach der Anzahl der Isopreneinheiten eingeteilt. Monoterpene bestehen aus zwei, Sesquiterpene aus drei, Diterpene aus vier, Triterpene aus sechs und Tetraterpene aus acht Isopreneinheiten. Beispiele für Monoterpene sind Limonen, Menthol, Campher, Citral und Citronellol. Farnesol gehört zu den Sesquiterpenen. Zu den Diterpenen zählt Phytol und zu den Triterpenen Squalen. β -Carotin ist ein Tetraterpen. Guttapercha und Kautschuk zählen zu den Polyisoprenen (BREITMAIER, 2005). Viele Terpene sind pharmakologisch interessant, ihre biologische Funktion ist allerdings nur lückenhaft erforscht. Manche (Citronellol) können als umweltfreundliche Insektizide verwendet werden (HIERRO ET AL., 2004). Außerdem wirken viele antimikrobiell. Viele Terpene werden als Duftstoffe in kosmetischen Produkten eingesetzt. In jüngster Zeit wurde festgestellt, daß Geraniol und verwandte Terpenoide Effekte auf eukaryontische Zellen haben. So konnte bei jungen Kamillensprößlingen durch Geraniol ein Apoptose-ähnlicher Zelltod ausgelöst werden (IZUMI ET AL., 1999). Auch bei Pankreaskrebszellen wurde gezeigt, daß Geraniol und Farnesol deren Wachstum inhibiert und deren Apoptoserate erhöht (BURKE ET AL., 1997, BURKE ET AL., 2002). Des Weiteren konnte bei Darm- und Brustkrebszelllinien gezeigt werden, daß Geraniol mit der Zellmembran interagiert und so die Aufnahme von Chemotherapeutika erleichtert wird (CARNESECCHI ET AL., 2002a, CARNESECCHI ET AL., 2002b, CARNESECCHI ET AL., 2004, DUNCAN ET AL., 2004).

Während die Biosynthese der Terpene über den Acetat-Mevalonat-Weg, bzw. über den DXP (1-Deoxyxylulose-5-phosphat)-Weg bereits sehr gut erforscht ist (BREITMAIER, 2005, CHANG ET AL., 2006), ist über den Abbau von Terpenen in Mikroorganismen bis jetzt recht wenig bekannt.

1.2 Abbau von Terpenoiden

Azyklische Monoterpene wie Citronellol und Geraniol, deren Abbau durch Pseudomonaden in dieser Arbeit untersucht wurde, besitzen eine β -ständige Methylgruppe, die den Abbau dieser Substanzen durch β -Oxidation im Fettsäureabbau verhindert (Abb. 1.1).

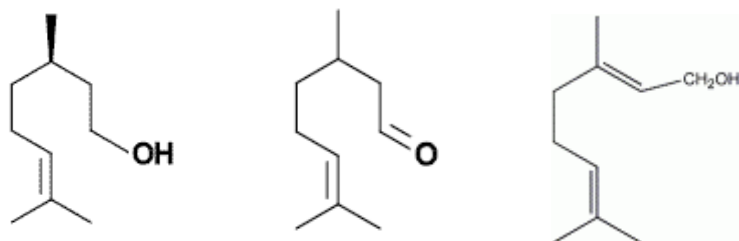


Abb. 1.1: Die azyklischen Monoterpene Citronellol, Citronellal und Geraniol

Der Abbau von azyklischen Terpenoiden mit solchen β -verzweigten Methylgruppen konnte erstmals in den 60er Jahren an dem aufgrund seiner Fähigkeit, Citronellol als alleinige C-Quelle zu verwerten, isolierten Stamm *Pseudomonas citronellolis* untersucht werden (SEUBERT, 1960, SEUBERT & REMBERGER, 1963, SEUBERT ET AL., 1963, SEUBERT & FASS, 1964a, SEUBERT & FASS, 1964b). Bei diesen Studien wurde anhand von abgefangenen und analysierten Zwischenprodukten und aufgereinigten Enzymen ein Stoffwechselweg zum Abbau von Citronellol und Geraniol vorgeschlagen (Abb. 1.2). Die Terpenalkohole Citronellol und Geraniol werden zu Beginn des Abbaus zu den entsprechenden Säuren oxidiert. Da sich Citronellol und Geraniol nur durch eine Doppelbindung unterscheiden, wurde angenommen, daß diese Reaktionen durch die selben Enzyme katalysiert werden (CANTWELL ET AL., 1978). Im Anschluß werden Citronellsäure und Geranylsäure durch eine Synthetase zu CoA-Thioestern aktiviert. Citronellyl-CoA wird darauf durch eine Dehydrogenase zu *cis*-Geranyl-CoA umgewandelt. Auf dieser Stufe vereinigt sich nun der Abbau von Geraniol und Citronellol.

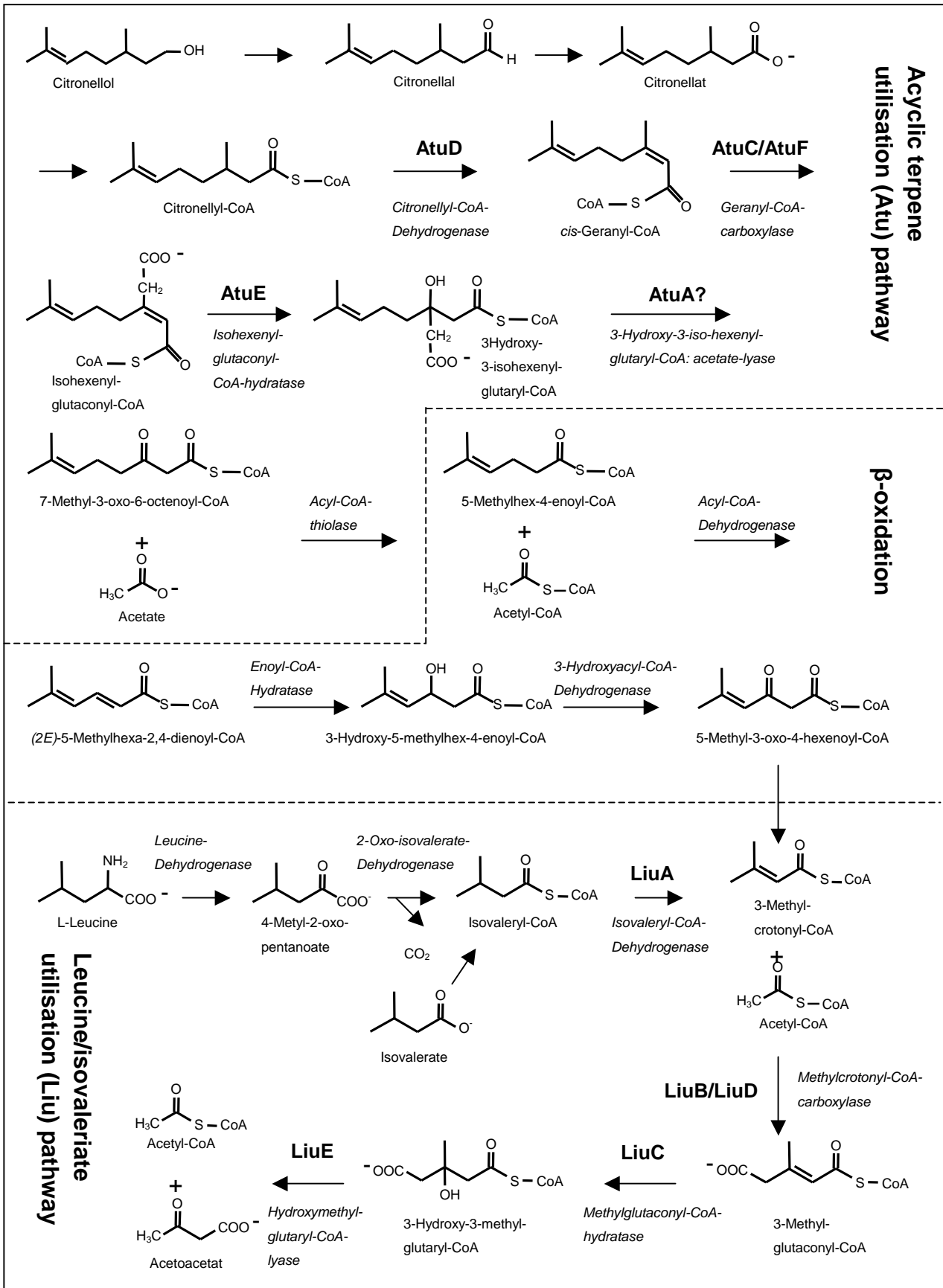


Abb. 1.2: Citronellolabbauweg in *P. citronellolis* und *P. aeruginosa* PAO1 nach SEUBERT & FASS, 1964b

Die β -Methylgruppe des Geranyl-CoAs wird nun durch die Geranyl-CoA-Carboxylase carboxyliert. Darauf folgt eine Anlagerung von Wasser am selben C-Atom durch die Isohexenyl-glutaconyl-CoA-Hydratase. Nun kann die carboxylierte β -Methylgruppe als Acetat durch eine Lyase abgespalten werden (SEUBERT & FASS, 1964a). Das so entstandene Produkt 7-Methyl-3-oxo-6-octenoyl-CoA wird nun durch β -Oxidation unter Abspaltung von zwei Molekülen Acetyl-CoA bis zum 3-Methyl-crotonyl-CoA abgebaut, das in den Leucinabbau, der analog zum Citronellolabbau abläuft, eingeht: 3-Methyl-crotonyl-CoA wird an der β -ständigen Methylgruppe durch eine Carboxylase carboxyliert, worauf wiederum eine Wasseranlagerung am selben C-Atom durch eine Hydratase erfolgt. Das Produkt 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA wird nun durch eine Lyase in Acetoacetat und Acetyl-CoA gespalten, die im weiteren Stoffwechsel umgesetzt werden können.

In den 70er Jahren wurde die Erforschung des Citronellolabbaus durch R. FALL und Mitarbeiter wieder aufgenommen. Dabei konnte festgestellt werden, daß nicht nur *P. citronellolis* sondern auch *P. aeruginosa* und *P. mendocina* zum Abbau von Citronellol und Geraniol befähigt sind (CANTWELL ET AL., 1978). Des weiteren konnte die Annahme von SEUBERT bestätigt werden, daß die Geranyl-CoA-Carboxylase von *P. citronellolis* ein durch das Wachstum auf Isoprenoiden induziertes Enzym ist und als Substrat nicht nur Geranyl-CoA sondern auch Methyl-crotonyl-CoA akzeptiert (HECTOR & FALL, 1976). Bei weiteren Untersuchungen wurde festgestellt, daß die Geranyl-CoA-Carboxylase von *P. citronellolis* ein globuläres Protein mit einer molekularen Masse zwischen 520 und 580 kDa ist und vermutlich eine A_4B_4 -Stöchiometrie besitzt (FALL & HECTOR, 1977).

In neueren Untersuchungen konnten in *P. aeruginosa* PAO1 zwei Gencluster identifiziert werden, die am Abbau von Citronellol beteiligt sind, das *atu* (acylic terpene utilisation)- und das *liu* (leucine/isovalerate utilisation)-Gencluster (AGUILAR ET AL., 2006, , DIAZ-PEREZ ET AL., 2004, FÖRSTER-FROMME ET AL., 2006, HÖSCHLE ET AL., 2005). Es konnte gezeigt werden, daß *atuC* und *atuF* die β - und α -Untereinheiten der Geranyl-CoA-Carboxylase und *liuB* und *liuD* die β - und die α -Untereinheit der Methyl-crotonyl-CoA-Carboxylase kodieren (HÖSCHLE ET AL., 2005). Während das *liu*-Gencluster in vielen Pseudomonaden nachgewiesen werden kann (FÖRSTER-

FROMME ET AL., 2006, HÖSCHLE ET AL., 2005), ist das *atu*-Gencluster auf wenige, zum Citronellolabbau befähigten Pseudomonaden und wenige marine Mikroorganismen beschränkt (FÖRSTER-FROMME & JENDROSSEK, 2006, HÖSCHLE ET AL., 2005).

In weiteren Untersuchungen wurde gezeigt, daß der Abbau von Terpenoiden auch unter anaeroben Bedingungen unter Anwesenheit von Nitrat ablaufen kann. Es wurde festgestellt, daß *P. citronellolis* auch anaerob in der Lage ist, Citronellol, nicht aber Geraniol oder Nerol, abzubauen (HARDER & PROBIAN, 1995). Ferner wurden diverse denitrifizierende Stämme isoliert, die in der Lage waren, Linalool und auch zyklische Terpenoide wie Menthol abzubauen. Des weiteren wurde gezeigt, daß die Öffnung des Ringes von zyklischen Terpenoiden wie Menthol vermutlich mit einer Aktivierung zum CoA-Thioester einhergeht und das daraus resultierende azyklische Produkt in den Citronellolabbauweg nach SEUBERT & FASS, 1964b eingehen kann (HYLEMON & HARDER, 1998). Bei *Alcaligenes defragans* wurde gezeigt, daß beim anaeroben Abbau von azyklischen Terpenoiden wie Myrcen und zyklischen Terpenoiden wie Limonen und Pinen Geranylensäure bei Nitratlimitierung angereichert wird, die bei Kohlenstofflimitierung wieder abgebaut wird (HEYEN & HARDER, 2000).

Auch bei Pflanzen wurde eine Geranyl-CoA-Carboxylase gefunden (GUAN ET AL., 1999). Dieses, aus *Zea mays* isolierte Enzym, zeigte eine hohe Spezifität für sein Substrat und konnte im Gegensatz zur GCase aus *P. citronellolis* (HECTOR & FALL, 1976) 3-Methyl-crotonyl-CoA nicht umsetzen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß der Abbau von Terpenoiden in Pflanzen zumindest ähnlich wie in Pseudomonaden abläuft.

1.3 Ziele dieser Arbeit

In einer vorangegangenen Diplomarbeit wurden am Citronellolabbau beteiligte Gene von *P. citronellolis* durch Transposon-Mutagenese identifiziert. Dabei konnte festgestellt werden, daß das Gen *mgoB* für den Citronellolabbau essentiell ist. Dieser Aspekt wurde zu Beginn der vorliegenden Arbeit weiter untersucht. Des weiteren wurden kurz nach Beginn dieser Arbeit das *atu*- und das *liu*-Gencluster in *P. aeruginosa* PAO1 in der Doktorarbeit von BIRGIT HÖSCHLE aus der gleichen Arbeitsgruppe als am Citronellolabbau beteiligt identifiziert. Da *P. aeruginosa* PAO1

komplett sequenziert ist (STOVER ET AL., 2000, WINDSOR ET AL., 2005) und dies molekularbiologische Arbeiten erleichtert, wurden weitere Untersuchungen auch an *P. aeruginosa* PAO1 durchgeführt. Der von SEUBERT (SEUBERT & FASS, 1964b) vorgeschlagene Citronellolabbauweg sollte überprüft und weitere Gene des *atu*- und des *liu*-Genclusters funktionell zugeordnet werden. Ferner sollten weitere am Citronellolabbau beteiligte Gene außerhalb des *atu*- und *liu*-Genclusters identifiziert und untersucht werden, ob das *atu*-Gencluster auch in *P. citronellolis* vorhanden ist.

2 Der Citronellolstoffwechsel in *P. citronellolis* und *P. aeruginosa* PAO1

2.1 Die zum Citronellolabbau befähigten Pseudomonaden

Pseudomonas citronellolis wurde in den 60er Jahren aufgrund seiner Befähigung Citronellol als alleinige C-Quelle zu verwerten aus einer Bodenprobe isoliert (SEUBERT, 1960). Des weiteren wurde festgestellt, daß *P. citronellolis* auch Geraniol und Farnesol verwerten kann. An *P. citronellolis* wurde der Citronellolstoffwechsel erstmals biochemisch untersucht. Der Schwerpunkt dieser Arbeiten lag auf den von der Geranyl-CoA-Carboxylase, der Isohexenyl-glutaconyl-CoA-Hydratase und der 3-Hydroxy-3-iso-hexenyl-glutaryl-CoA:acetate-lyase katalysierten Reaktionen (SEUBERT, 1960, SEUBERT & REMBERGER, 1963, SEUBERT ET AL., 1963, SEUBERT & FASS, 1964a, SEUBERT & FASS, 1964b).

In den Arbeiten von CANTWELL ET AL., 1978 wurde untersucht, ob weitere Pseudomonaden außer *P. citronellolis* zum Citronellolabbau befähigt sind. Der in dieser Arbeit verwendete Stamm von *P. citronellolis* war allerdings nicht der, der von SEUBERT an die American Type Culture Collection weitergegeben wurde. Dieser ursprünglich als *P. citronellolis* isolierte Stamm konnte nicht am Leben erhalten werden. Es wurde festgestellt, daß *P. aeruginosa* ATCC 17423, *P. mendocina* ATCC 13525 und *P. citronellolis* ATCC 13674 zum Abbau von Citronellol, Geraniol und Citronellsäure befähigt sind. Außerdem konnte festgestellt werden, daß diese drei Stämme sowohl *trans*- als auch *cis*-Geranylsäure verwerten können. Phytol als C₂₀-Isoprenol konnte nur von *P. syringae* NCPPB 1906 verwertet werden. Nerol konnte von *P. citronellolis* gut, von *P. aeruginosa* und *P. mendocina* nur schlecht verwertet werden. Farnesol, ein C₁₅-Isoprenol konnte nur von *P. citronellolis*, *P. aeruginosa*, *P. mendocina* und *P. syringae* als C-Quelle genutzt werden. Allerdings war das Wachstum mit Farnesol eingeschränkt. *P. putida* ATCC 23287, *P. testosteroni* ATCC 11996, *P. caryophylli* ATCC 25418, *P. fluorescens* ATCC 13525 und *P. cepacia* ATCC10856 konnten keine der genannten Substanzen verwerten.

In der vorliegenden Arbeit konnte außerdem festgestellt werden, daß *P. fluorescens* Pf-5 (ATCC BAA-477) mit Citronellol und Citronellsäure, nicht aber mit Geraniol und Geranolsäure als alleiniger C-Quelle wächst. *P. putida* KT2440 (ATCC 47054) kann weder mit Citronellol noch Geraniol als alleinige C-Quelle wachsen.

Offensichtlich ist die Befähigung zum Abbau von Citronellol und Geraniol eine nicht sehr weit verbreitete Eigenschaft, und bis heute konnten nur sehr wenige Spezies als zum Citronellolabbau befähigt identifiziert werden. Allerdings konnte vor kurzem eine neue Spezies, *P. delhiensis*, isoliert werden, welche die Befähigung zum Citronellolabbau besitzt (PRAKASH ET AL., 2007).

2.2 Die in den Citronellolabbau involvierten Gene

2.2.1 Das *atu* (acyclic terpene utilisation)- und das *liu* (leucine/isovalerate utilisation)-Gencluster

In *P. aeruginosa* PAO1 konnten durch Transposon- und Insertionsmutagenese zwei Gencluster identifiziert werden, die in den Abbau von Citronellol involviert sind: das *atu*-Gencluster (FÖRSTER-FROMME ET AL., 2006, HÖSCHLE ET AL., 2005) und das *liu*-Gencluster (DIAZ-PEREZ ET AL., 2004, HÖSCHLE ET AL., 2005, Abb. 2.1). Die potentiellen Funktionen der Genprodukte im Citronellolstoffwechsel sind in Abb.1.2 dargestellt.

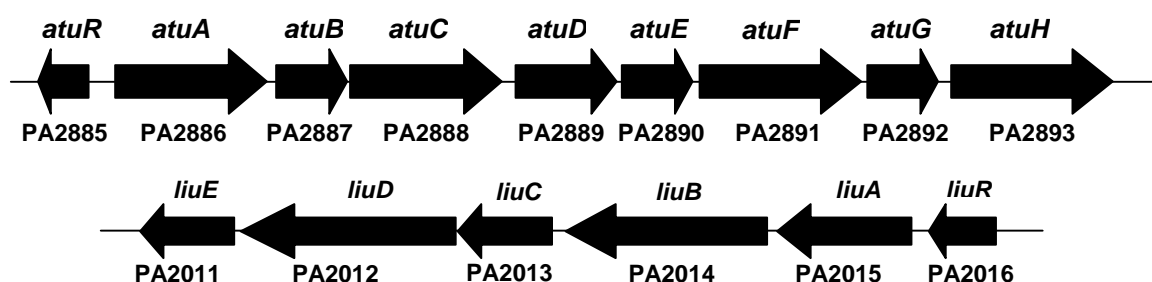


Abb.2.1: Das *atu*- und das *liu*-Gencluster von *P. aeruginosa* PAO1

Das *atu*-Gencluster, *atuRABCDEFGH*, besteht aus 8 Genen und einem Regulatorgen. *atuA* konnte bisher funktionell nicht zugeordnet werden und ist als hypothetisches Protein in der *P. aeruginosa* PAO1-Datenbank annotiert. Es zeigt mit

keinen funktionell zugeordneten Genen Ähnlichkeiten. Im Citronellolstoffwechsel könnte dieses Gen die Rolle der 3-Hydroxy-3-iso-hexenyl-glutaryl-CoA:acetate-Lyase übernehmen. Bei *P. aeruginosa* PAO1 zeigte eine Insertionsmutante in diesem Gen, daß *AtuA* essentiell für den Citronellolabbau ist, da eine Mutation in diesem Gen, bei der das Plasmid pKnockout-G (WINDGASSEN et al., 2000) in das Gen integriert wurde, zum Verlust der Befähigung Citronellol und Geraniol zu verwerten führt (FÖRSTER-FROMME ET AL., 2006). Bei *P. citronellolis* zeigte eine Insertionsmutante in *atuA* ebenfalls diesen Phänotyp (FÖRSTER-FROMME & JENDROSSEK, 2006). Bei dieser Art der Herstellung von Insertionsmutanten wurde immer darauf geachtet, daß der auf dem Plasmid befindliche, in *P. aeruginosa* konstitutive *lac*-Promoter in Leserichtung des inaktivierten Gens befand. Dadurch wurden stromabwärts der Insertion liegende Gene konstitutiv exprimiert und so „Downstream“-Effekte vermieden. *AtuB* und *AtuG* sind als potentielle Dehydrogenasen annotiert und könnten die Oxidation der Terpenalkohole zu den entsprechenden Säuren katalysieren. *AtuC* und *AtuF* stellen die Untereinheiten der Geranyl-CoA-Carboxylase dar, wobei *AtuF* der biotinhaltigen Untereinheit entspricht (HÖSCHLE ET AL., 2005). *AtuD* wurde als potentielle Acyl-CoA-Dehydrogenase annotiert. Im *Atu*-Stoffwechselweg gibt es eine Reaktion, die Dehydrogenierung von Citronellyl-CoA zu Geranyl-CoA, die *AtuD* katalysieren könnte. Diese Funktion konnte auch experimentell nachgewiesen werden und wird im Abschnitt 2.4 ausführlich beschrieben. *AtuE* wurde als potentielle Enoyl-CoA-Hydratase annotiert und katalysiert vermutlich die Reaktion von Isohexenylglutaconyl-CoA zu 3-Hydroxy-3-iso-hexenyl-glutaryl-CoA. *AtuG* und *AtuH* wurden als potentielle Dehydrogenase, beziehungsweise potentielle „very-long chain“ Acyl-CoA Synthetase annotiert und könnten die Oxidation der Terpenalkohole zu den Terpensäuren, bzw. die Aktivierung von Citronellsäure zum CoA-Thioester katalysieren.

In dieser Arbeit wurden bei *P. aeruginosa* PAO1 von allen *atu*-Genen Insertionsmutanten hergestellt (FÖRSTER-FROMME ET AL., 2006). Die Phänotypen der Mutanten sind in Tabelle 2.1 zu finden. Bis auf *atuE*, *atuG* und *atuH* sind alle *atu*-Gene essentiell für die Verwertung von Citronellol.

Tabelle 2.1: Phänotypen von *P. aeruginosa* PAO1 WT und Insertionsmutanten in den *atu*-Genen (nach FÖRSTER-FROMME ET AL., 2006)

Stamm	C	G	CS	GS	Leu	IV	Suc
PAO1 WT	++	+	++	++	+	++	++
PAO1 ins- <i>atuA</i>	-*	-	-*	-	+	++	++
PAO1 ins- <i>atuB</i>	-*	-	-*	-	+	++	++
PAO1 ins- <i>atuC</i>	-	-	-	-	+	++	++
PAO1 ins- <i>atuD</i>	-*	-*	-*	-	+	++	++
PAO1 ins- <i>atuE</i>	+	+	+	+	+	++	++
PAO1 ins- <i>atuF</i>	-*	-	-*	-	+	++	++
PAO1 ins- <i>atuG</i>	++	+	++	++	+	++	++
PAO1 ins- <i>atuH</i>	++	+	++	++	+	++	++

Legende: Die Mikroorganismen wuchsen 4 Tagen bei 30°C auf A garplatten mit den entsprechenden C-Quellen. C: Citronellol, G: Geraniol, CS: Citronellsäure, GS: Geranylsäure, Leu: Leucin, IV: Isovaleriansäure, Suc: Succinat. ++: sehr gutes Wachstum, +: gutes Wachstum, +/-: eingeschränktes Wachstum, -: kein Wachstum. *: Einzelkolonien tauchen spontan während des Wachstums auf (evt. Suppressionsmutanten).

Gencluster, die zum *atu*-Gencluster von *P. aeruginosa* PAO1 hohe Ähnlichkeiten aufweisen, konnten auch in anderen Pseudomonaden und anderen Species identifiziert werden. Da *P. citronellolis* als erste zum Citronellolabbau befähigte Art beschrieben wurde, wurde zu Beginn dieser Arbeit in dem Genom dieses Organismus das *atu*-Gencluster mit Hilfe von Gensonden, die für *P. aeruginosa* PAO1 *atu*-Gene spezifisch waren, identifiziert. Dieses Gencluster wurde kloniert, sequenziert und es konnte eine sehr hohe Identität auf DNA- und Aminosäureebene zu dem *P. aeruginosa* PAO1 *atu*-Gencluster festgestellt werden (FÖRSTER-FROMME & JENDROSSEK, 2006, Abb. 2.2).



Abb. 2.2: Das *atu*-Gencluster aus *P. citronnellolis*

Des Weiteren konnte in *P. aeruginosa* PA14, *P. mendocina* und *P. fluorescens* Pf-5 durch Sequenzdatenbankrecherchen je ein potentiell *atu*-Gencluster gefunden werden. Allerdings fehlen *P. fluorescens* Pf-5 die Gene *atuG* und *atuH*, und der Organismus kann nur Citronellol, aber kein Geraniol abbauen. Da alle anderen Pseudomonaden, die sowohl Geraniol als auch Citronellol verwerten können, das komplette *atu*-Gencluster besitzen, könnte ein Zusammenhang zwischen der Befähigung, Geraniol verwerten zu können und dem Vorhandensein der Gene *atuG* und *atuH* bestehen. Jedoch bewirken Mutationen in *atuG* und *atuH* bei *P. aeruginosa* PAO1 keine Veränderung des Phänotyps im Vergleich zum Wildtyp (FÖRSTER-FROMME ET AL., 2006). Des Weiteren wurden potentielle *atu*-Gencluster in den marinen Mikroorganismen *Hahella chejuensis* KCTC 2396 und *Marinobacter aquaeolei* VT 8 gefunden. Jedoch konnte bisher kein Wachstum mit Citronellol als alleiniger C-Quelle für diese beiden Organismen nachgewiesen werden.

Das *liuRAliuBCDE* Gencluster enthält 5 Strukturgene und ein potentiell regulatorisches Gen, *liuR*. *liuA* codiert für eine potentielle Acyl-CoA Dehydrogenase. Dessen Funktion als Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase konnte in dieser Arbeit experimentell verifiziert werden (siehe 2.10). *liuB* bildet zusammen mit *liuD* die Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase (HÖSCHLE ET AL., 2005). *liuC* wurde als potentielle Enoyl-CoA Hydratase annotiert. Das Genprodukt katalysiert vermutlich die Konversion von 3-Methyl-glutaconyl-CoA zu 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA. *liuE* codiert vermutlich für die Hydroxymethylglutaryl-CoA-Lyase. Mit Hilfe von 2-D-Gelelektrophoreseexperimenten konnte nachgewiesen werden, daß *liuA*, *liuB* und *liuC* beim Wachstum auf Isovaleriansäure und Isoprenoiden exprimiert werden. *liuD* konnte durch Western Blot Experimente nachgewiesen werden (FÖRSTER-FROMME ET AL., 2006).

2.2.2 Weitere in den Citronellolabbau involvierte Gene

Um Aussagen treffen zu können, welche Gene außer den *atu*- und den *liu*-Genclustern in den Citronellstoffwechsel involviert sind, wurden 2D-Gelelektrophoreseexperimente durchgeführt. Dabei wurden Proteinmuster von *P. aeruginosa* PAO1-Zellen, die mit Succinat, Isovaleriansäure, Citronellol, Geraniol, Citronellal, Citronellsäure oder Geranylsäure als C-Quelle gewachsen waren, verglichen. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf Proteinspots gelegt, die in den Proteinmustern von Zellen, die mit Citronellol, Geraniol, Citronellal, Citronellsäure, Geranylsäure oder Isovaleriansäure als C-Quelle gewachsen waren, vorhanden waren, aber in den Proteinmustern von Zellen, die mit Succinat als C-Quelle gewachsen waren, nicht vorhanden waren. Proteinspots von Interesse wurden ausgeschnitten, tryptisch verdaut und die erhaltenen Peptide massenspektrometrisch untersucht und die Ergebnisse mit einer *P. aeruginosa* PAO1-Datenbank verglichen (FÖRSTER-FROMME ET AL., 2006) Die identifizierten Proteine, ihre annotierte Funktion und ihr Vorkommen in Proteinmustern sind in Tab. 2.2 aufgelistet.

Tab. 2.2: Mit Hilfe von 2-D-Gelelektrophoreseexperimenten identifizierte Proteine, die spezifisch beim Wachstum auf Citronellol, Citronellal, Citronellsäure, Geraniol und Geranylsäure exprimiert werden.

PA-Nr.	Annotierte Funktion	Suc	IV	C	CI	CS	G	GS
1342	ABC transporter, periplasmic binding protein, put. aspartate/glutamate binding protein	-	-	+	+	+	+	+
1535	Probable acyl-CoA dehydrogenase	-	-	+	+	+	+	+
1562	Aconitase <i>acnA</i>	-	-	?	+	?	?	?
1587	Lipoamide dehydrogenase, <i>lpaG</i>	?	?	+	?	?	+	+
1787	Aconitase <i>acnB</i>	-	+	?	+	?	?	?
1982	Quinoprotein alcohol dehydrogenase	-	-	-	-	-	+	+
1999	Probable CoA transferase, α -subunit, <i>atoD</i>	-	+	+	+	+	+	+
2001	Acetyl-CoA acetyltransferase, <i>atoB</i>	-	+	+	+	+	+	+
2013	Methylglutaconyl-CoA hydratase, <i>liuC</i>	-	+	+	+	+	+	+

PA-Nr.	Annotierte Funktion	Suc	IV	C	CI	CS	G	GS
2014	Methylcrotonyl-CoA carboxylase, β -subunit, liuB	-	+	+	+	+	+	+
2015	Probable acyl-CoA dehydrogenase, liuA	-	+	+	+	+	+	+
2553	Probable acyl-CoA thiolase (β -ketothiolase)	-	+	+	+	+	+	+
2554	Probable short-chain dehydrogenase	-	+	+	+	+	?	?
2643	Probable isocitrate lyase	-	+	+	+	+	+	+
2886	Hypothetical protein, atuA	-	-	+	+	+	+	+
2887	Probable short-chain dehydrogenase, atuB	-	-	+	+	+	+	+
2890	Probable enoyl-CoA hydratase/isomerase, atuE	-	-	+	+	+	+	+
2891	Geranyl-CoA carboxylase, α -subunit, atuF	-	-	+	+	+	+	+
2892	Probable short chain dehydrogenase, atuG	-	-	+	+	+	+	+
2893	Probable very long chain acyl-CoA synthetase, atuH	-	-	+	+	+	+	+
3922	Hypothetical exported protein	?	+	+	+	+	+	+
4275	Transcription antitermination protein, nusG	-	-	-	-	-	+	+
4330	Probable enoyl-CoA hydratase/isomerase	-	-	+	+	+	+	+
5035	Glutamate synthase small chain, gluD	?	?	?	?	?	+	+
5489	Thiol:disulfide interchange protein, dsbA	-	+	-	-	-	-	-

Legende: PA-Nr.: Nummer des Gens im Genom von *P. aeruginosa* PAO1. C-Quellen, mit denen die Zellen, von denen die analysierten Proteinrohextrakte stammten, gewachsen waren: Suc: Succinat, IV: Isovaleriansäure, C: Citronellol, CI: Citronellal, CS: Citronellsäure, G: Geraniol, GS: Geranolsäure. +: Proteinspot vorhanden, -: Proteinspot nicht vorhanden, ?: Vorhandensein des Proteinspots unklar. Identifizierte Genprodukte des *atu*- und *liu*-Genclusters sind durch Fettdruck hervorgehoben.

Unter den identifizierten Proteinen befanden sich auch fast alle *Atu*- und *Liu*-Proteine mit Ausnahme von *AtuC*, *AtuD*, *LiuD* und *LiuE*, was die Beteiligung dieser Proteine am Citronellolstoffwechsel nochmals bestätigte. *AtuC* und *LiuD* konnten durch Massenspektrometrie von aufgereinigten Biotin-abhängigen Proteinen als spezifisch

beim Wachstum auf Terpenoiden, bzw. Leucin und Isovaleriansäure exprimiert nachgewiesen werden (HÖSCHLE ET AL., 2005). Außerdem konnten drei Proteine identifiziert werden, die vermutlich im Glyoxylatzyklus eine Rolle spielen, PA1562 und PA1787, zwei potentielle Aconitasen und PA2643, eine potentielle Isocitratlyase. Da bei *P. citronellolis* festgestellt wurde, daß die Endprodukte des Citronellolabbaus, Acetat, Acetoacetat und Acetyl-CoA, in den Glyoxylatzyklus eingehen (FÖRSTER-FROMME & JENDROSSEK, 2005), ist dies ein Hinweis darauf, daß auch bei *P. aeruginosa* PAO1 der Glyoxylatzyklus am Citronellolabbau beteiligt ist (siehe 2.9). Des weiteren konnte PA1982, eine quinonabhängige Alkoholdehydrogenase, identifiziert werden, deren Beteiligung am Citronellolstoffwechsel gezeigt werden konnte (siehe 2.3.2). Zwei weitere identifizierte Proteine, PA1999, AtoD und PA2001, AtoB, stellen Proteine des vermutlich 5 Gene umfassenden *ato*-Genclusters dar (PA1998-2002). *ato*-Gene wurden in *E. coli* als in den Fettsäureabbau involviert identifiziert (JENKINS & NUNN, 1987). Es besteht die Möglichkeit, daß die Gene des *ato*-Genclusters für Proteine codieren, welche die Schritte der β -Oxidation, die den Atu- mit dem Liu-Stoffwechsel verbindet, katalysieren. Proteine, die ebenfalls an der β -Oxidation beteiligt sein können, sind die identifizierten Proteine PA2553, eine potentielle Acyl-CoA-Thiolase und PA2554, eine potentielle „Short Chain“-Dehydrogenase. Diese Proteine werden von Genen codiert, die Teil eines sechs Gene umfassenden Genclusters darstellen (PA2552-PA2557). Von PA1535, einer potentiellen Acyl-CoA Dehydrogenase, konnte die Beteiligung am Citronellolstoffwechsel gezeigt werden (siehe 2.4). Die Rollen der weiteren identifizierten, vermutlich indirekt am Citronellolstoffwechsel beteiligten Proteine, ist noch unklar.

In früheren Arbeiten wurde festgestellt, daß die Oxidation von Geraniol zu Geranylsäure bei *P. aeruginosa* PAO1 molybdänabhängig ist (HÖSCHLE & JENDROSSEK, 2005). Eine Transposonmutante im Gen *moeA*, einem Gen, dessen Genprodukt eine zentrale Rolle bei der Synthese von Molybdäncofaktoren spielt, konnte Geraniol als C-Quelle nicht mehr verwerten. Des weiteren konnte das Wachstum von PAO1 auf Geraniol durch Wolframat, einem Inhibitor von molybdänabhängigen Umsätzen, gehemmt werden. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob bei *P. citronellolis* der Umsatz von Geraniol ebenfalls

molybdänabhängig ist. Dafür wurde Wolframat zu dem Wachstumsmedium gegeben. Es zeigte sich, daß die Gabe von Wolframat keine Auswirkung auf das Wachstum mit Geraniol als C-Quelle bei *P. citronellolis* hatte. Daraus kann geschlossen werden, daß die Oxidation von Geraniol zur Geranylensäure bei *P. citronellolis* vermutlich keinen molybdänabhängigen Schritt beinhaltet.

2.3 Die Oxidation der Terpenalkohole zu den Terpensäuren

Die ersten beiden Schritte des Citronellolstoffwechsels stellt die Oxidation der OH-Gruppe des Terpenalkohols Citronellol zur Carboxylgruppe dar (Abb.2.3).

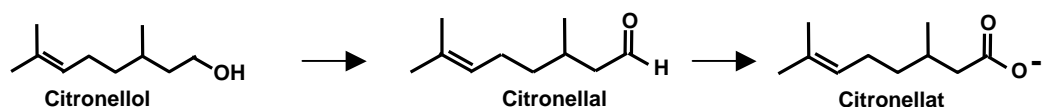


Abb. 2.3: Reaktionsschema der Oxidation von Citronellol zu Citronellat

Seubert konnte zeigen, daß Citronellol, das als alleinige C-Quelle zu einer *P. citronellolis*-Kultur gegeben war, innerhalb von 1-2 Tagen nicht mehr nachweisbar war (SEUBERT, 1960). Das Intermediat Citronellsäure ließ sich allerdings über einen längeren Zeitraum hin noch nachweisen. Der Abbau von Geraniol verläuft analog. Diese Erkenntnis war ein Hinweis sowohl auf die schnelle Oxidation des Terpenalkohols zur Terpensäure als auch darauf, daß der nächste Schritt des Stoffwechsels geschwindigkeitslimitierend ist. Unbekannt ist, welche Enzyme diese Reaktionen katalysieren und welcher Co-Faktor für diese Oxidation verwendet wird. In den Arbeiten von SEUBERT gibt es keine Hinweise darauf. Die Terpenaldehyde, Citronellal und Geraniol, können aber beide als alleinige C-Quelle sowohl von *P. citronellolis* als auch von *P. aeruginosa* PAO1 verwertet werden. Im *atu*-Gencluster sind zwei vermeintliche Dehydrogenasen zu finden, *atuB* und *atuG*, die an der Oxidation der Terpenalkohole und -aldehyde beteiligt sein könnten.

In der vorliegenden Arbeit wurden Experimente zur NAD⁺- und NADP⁺-abhängigen Oxidation der Terpenalkohole und Terpenaldehyde durchgeführt sowie die Beteiligung einer quinonabhängigen Alkoholdehydrogenase, PA1982, siehe auch 2.2, an der Oxidation der Terpenalkohole und Terpenaldehyde überprüft. Im Rahmen

einer Studienarbeit wurde außerdem die Rolle von *atuB* an der Oxidation der Terpenalkohole und -aldehyde untersucht (HANDKE, 2007). Dabei konnte allerdings nicht gezeigt werden, daß in *E. coli* exprimiertes AtuB die Terpenalkohole und Terpenaldehyde umsetzt. Eine *P. aeruginosa* PAO1-Mutante in *atuG*, bei der das Plasmid pKnockout-G (WINDGASSEN ET AL., 2000) in das Gen integriert wurde, zeigte beim Wachstum keinen Unterschied zum PAO1 WT. Daraus kann geschlossen werden, daß das Gen nicht essentiell zum Wachstum auf Citronellol und Geraniol ist. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, daß *atuG* an der Oxidation der Terpenalkohole und -aldehyde beteiligt ist.

2.3.1 Die NAD⁺- und NADP⁺-abhängige Oxidation der Terpenalkohole und Terpenaldehyde

Um zu überprüfen, ob die Oxidation der Terpenalkohole NAD⁺-, bzw. NADP⁺-abhängig ist, wurden Enzymtests mit Rohextrakten von *P. aeruginosa* PAO1 auf NAD(P)⁺-abhängige Dehydrogenaseaktivität durchgeführt. Bei diesen Experimenten konnte festgestellt werden, daß ein NAD⁺-abhängiger Umsatz bei Zugabe von Geraniol, Citronellol, Citronellal oder Geranial als Enzymsubstrat mit Rohextrakten von *P. aeruginosa* PAO1 meßbar war. Auch wenn die bestimmten spezifischen Aktivitäten recht gering waren (zwischen 0,25 mU/mg und 7,7 mU/mg), konnte ein deutlicher Unterschied zwischen Rohextrakten von Zellen, die mit Citronellol oder Geraniol gewachsen waren, und von Zellen, die mit Glucose als C-Quelle gewachsen waren, festgestellt werden. Mit Citronellal als Enzymsubstrat konnten die höchsten Aktivitäten gemessen werden. Citronellal, Geranial und Geraniol werden also von einem NAD⁺-abhängigen Enzym umgesetzt und dessen Aktivität war bei Zellen, die mit einem Terpenalkohol als C-Quelle gewachsen waren, deutlich erhöht. Möglich ist aber auch, daß zwei unterschiedliche Enzyme an diesen Umsätzen beteiligt waren, nämlich ein konstitutiv exprimiertes, das verschiedene Arten von Alkoholen und Aldehyden umsetzt und ein spezifisches, durch Terpenalkohole und/oder -aldehyde induziertes, das Terpenalkohole und -aldehyde umsetzt. Die Werte, die mit Citronellol, Geraniol oder Geranial als Substrat gemessen wurde, sind allesamt sehr gering und lassen keine eindeutige Aussage zu. Es konnte zwar ein NAD⁺-abhängiger Umsatz dieser Substanzen gemessen werden, aber es bleibt

fraglich, ob dieser Umsatz von spezifisch induzierten Enzymen oder von Alkohol-, bzw. Aldehyddehydrogenasen mit breitem Substratspektrum, die eventuell sogar konstitutiv exprimiert werden, herrührt. Die gemessenen spezifischen Aktivitäten sind im Anhang 5 in Tabelle 1 zu finden.

Versuche mit NADP⁺ als Co-Faktor ergaben wesentlich geringere Enzymaktivitäten als Umsätze mit NAD⁺ als Co-Faktor (zwischen 1,2 mU/mg und 4 mU/mg). Es konnte bei Rohextrakten von Zellen, die mit Glucose als alleiniger C-Quelle gewachsen waren, mit keinem der vier Enzymsubstrate Aktivität nachgewiesen werden. Rohextrakte von Zellen, die mit Geraniol als C-Quelle gewachsen waren, zeigten nur mit Citronellol und Geraniol als Enzymsubstrat NADP⁺-abhängige Aktivitäten. Mit Rohextrakten von Zellen, die mit Citronellol gewachsen waren, konnten für Citronellol, Geraniol und Citronellal als Enzymsubstrat Aktivitäten bestimmt werden. Mit Geraniol als Enzymsubstrat konnte in keinem Fall Aktivität nachgewiesen werden. Die gemessenen spezifischen Aktivitäten sind im Anhang 5 in Tabelle 2 zu finden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß eine NADP⁺-abhängige Oxidation der Terpenalkohole und -aldehyde unwahrscheinlich ist. Die gemessenen, sehr geringen Aktivitäten sind vermutlich auf eine NADP⁺-abhängige Dehydrogenase mit breiterem Substratspektrum zurückzuführen. Unklar ist, warum Citronellal als Aldehyd als Enzymsubstrat akzeptiert wird, Geraniol aber nicht. Auch ist NADP⁺ als Co-Faktor eher in anabolen als in katabolen Stoffwechselwegen zu finden.

Um die NAD⁺-, bzw. NADP⁺-abhängige Oxidation der Terpenalkohole und -aldehyde weiter zu untersuchen, könnten Proteinrohextrakte von Zellen, die mit Terpenalkoholen und -aldehyden als C-Quelle gewachsen waren, beispielsweise über Ionenaustauschersäulen aufgereinigt werden, und die Aktivitäten der einzelnen Aufreinigungsfractionen auf NAD⁺-, bzw. NADP⁺-abhängigen Umsatz der Terpenalkohole und -aldehyde hin untersucht werden. Fractionen, in denen diese Aktivität nachgewiesen werden kann, könnten über 2D-Gelelektrophorese mit anschließendem MALDI-ToF weiter analysiert werden, um festzustellen, welche Proteine in diesen Fractionen vorhanden sind und welche von ihnen an der Oxidation beteiligt sein könnten. Diese könnten dann kloniert und in *E. coli* exprimiert werden, um deren Funktionen weiter zu untersuchen.

2.3.2 Die Rolle der Quinon-Alkoholdehydrogenase, PA1982, bei der Oxidation der Terpenalkohole und -aldehyde

Bei 2-D-Gelelektrophoreseexperimenten wurde PA1982, eine quinonabhängige Alkoholdehydrogenase, als Protein identifiziert, das in Proteinmustern von Zellen, die mit Geraniol, Geranial und Geranylensäure als C-Quelle gewachsen waren, vorhanden war. Dieses Protein war nicht in Proteinmustern von Zellen, die mit Succinat oder Isovaleriansäure gewachsen waren, vorhanden. Bei Proteinmustern von Zellen, die mit Citronellol, Citronellal und Citronellsäure gewachsen waren, konnte das Protein ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Die Expression des PA1982-Proteins wurde also vermutlich durch Geraniol, Geranial und Geranylensäure induziert, und PA1982 könnte demnach in den Terpenstoffwechsel involviert sein. Ein Protein, das eine 100%ige Identität bezüglich der Aminosäuresequenz zu PA1982 aufweist, wurde in *P. aeruginosa* ATCC 17933 als Quinoprotein Ethanol-Dehydrogenase identifiziert (DIEHL ET AL., 1998).

Um zu überprüfen, ob eine quinonabhängige Alkoholdehydrogenase an der Oxidation der Terpenalkohole und -aldehyde beteiligt ist, wurden Enzymtests mit Rohextrakten von Zellen von *P. aeruginosa* PAO1, die mit Citronellol, Geraniol und Glucose als C-Quelle gewachsen waren, durchgeführt. Der Enzymtest basiert auf einer künstlichen Elektronentransportkette von Pyrroloquinolin-Quinon (PQQ), dem Co-Faktor des Enzyms, zu PMS und von PMS zu DCPIP. Bei diesen Enzymtests wurde die Abnahme der Absorption von DCPIP bei 600 nm verfolgt. Es zeigte sich, daß mit Citronellol als Enzymsubstrat unabhängig vom als Enzymlösung eingesetzten Rohextrakt, kein Umsatz verfolgt werden konnte. Offensichtlich wird Citronellol nicht von einer PQQ-abhängigen Dehydrogenase umgesetzt. Des weiteren konnte festgestellt werden, daß der Umsatz der weiteren eingesetzten Enzymsubstrate Geraniol, Citronellal und Geranial von der C-Quelle abhängt, mit denen die Zellen gewachsen waren. Rohextrakte von Zellen, die auf Glucose gewachsen waren, zeigten sehr geringe Aktivitäten. Bei Enzymtests mit Rohextrakten von Zellen, die mit Geraniol als C-Quelle gewachsen waren, konnten spezifische Aktivitäten zwischen 69 und 138 mU/mg bestimmt werden. Bei Rohextrakten von Zellen, die mit Citronellol als C-Quelle gewachsen waren, lagen die Werte zwischen 48 und 105 mU/mg (siehe Tabelle 3 im Anhang 5).

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, daß bei mit Citronellol gewachsenen Zellen vermutlich ein weiteres exprimiertes quinonabhängiges Enzym am Umsatz von Geraniol, Geranial und Citronellal beteiligt ist und bei mit Geraniol gewachsenen Zellen vermutlich das Genprodukt von PA1982 Geraniol, Citronellal und Geranial umsetzt. Es besteht auch die Möglichkeit, daß sich im zellfreien Rohextrakt von *P. aeruginosa* PAO1 ein quinonabhängiges Enzym befindet, das Geraniol, Citronellal und Geranial umsetzt und das bei Wachstum auf Citronellol und Geraniol verstärkt exprimiert wird. Da aber PA1982 nur in Proteinmustern von Zellen, die mit Geraniol, Geranial und Geranylsäure gewachsen waren, gefunden werden konnte, ist die erste Möglichkeit wahrscheinlicher.

Um die postulierte Funktion von PA1982 im Citronellolstoffwechsel zu überprüfen, wurde das Gen durch die Integration des Plasmids pKnockout-G (WINDGASSEN ET AL., 2000) inaktiviert. Diese Insertionsmutante, ins-PA1982, zeigte eingeschränktes Wachstum mit Ethanol, Geraniol, Citronellal, Geranial und Geranylsäure als C-Quelle, mit Citronellol und Citronellsäure als C-Quelle wuchs sie wie der Wildtyp. Um Aussagen treffen zu können, ob die Insertion Einfluß auf die meßbaren Enzymaktivitäten zeigte, wurden Rohextrakte von Zellen von ins-PA1982 hergestellt, die mit Citronellol, Geraniol und Isovaleriansäure als C-Quelle gewachsen waren. Diese Enzymlösungen wurden für Enzymtests, welche die Aktivität Quinonabhängiger Alkoholdehydrogenasen nachweisen sollten, eingesetzt. Es zeigte sich, daß die Aktivitäten bei Rohextrakten von Citronellol- und Isovaleriansäurezellen unerwartet hoch waren. Bei Rohextrakten von ins-PA1982-Citronellolzellen waren Aktivitäten bis zu 259 mU/mg meßbar, was mehr als das Doppelte der im Wildtyp gemessenen Aktivitäten war. Bei Rohextrakten von Isovaleriansäurezellen wurden Aktivitäten im Bereich der Wildtyp-Glucosezellen erwartet. Die ermittelten Werte waren aber wesentlich höher. Die Aktivitäten von ins-PA1982-Geraniolzellen waren dafür im Vergleich zu Wildtyp-Rohextrakten vor allem mit Geraniol als Substrat deutlich reduziert (siehe Tabelle 4 im Anhang 5).

Offenbar bewirkt eine Mutation in PA1982, daß andere quinonabhängige Dehydrogenasen verstärkt exprimiert werden, da auch bei Rohextrakten von Zellen, bei denen nur geringen Aktivitäten erwartet wurden, den Isovaleriansäurezellen,

recht hohe Aktivitäten bestimmt wurden. Im Genom von *P. aeruginosa* PAO1 sind weitere quinonabhängige Dehydrogenasen vorhanden (z.B. PA2680, PA4975, PA2953), deren Funktion unbekannt ist und die hier eine Rolle spielen könnten.

Um das Potential von PA1982 im Citronellolstoffwechsel besser abschätzen zu können, soll nun in der laufenden Diplomarbeit von A. CHATTOPADHYAY PA1982 kloniert und in *E. coli* exprimiert werden, um dessen Spezifität für Citronellole, Geraniol, Citronellal und Geranial bestimmen zu können.

2.4 Die Aktivierung der Citronellsäure als CoA-Thioester und die Einführung einer Doppelbindung

Citronellsäure wird vermutlich im Verlauf des Stoffwechsels von einer Acyl-CoA-Synthetase zu einem CoA-Thioester, dem Citronellyl-CoA, aktiviert. Im Anschluß folgt die Einführung einer Doppelbindung durch die Citronellyl-CoA-Dehydrogenase zum Geranyl-CoA (Abb. 2.4).

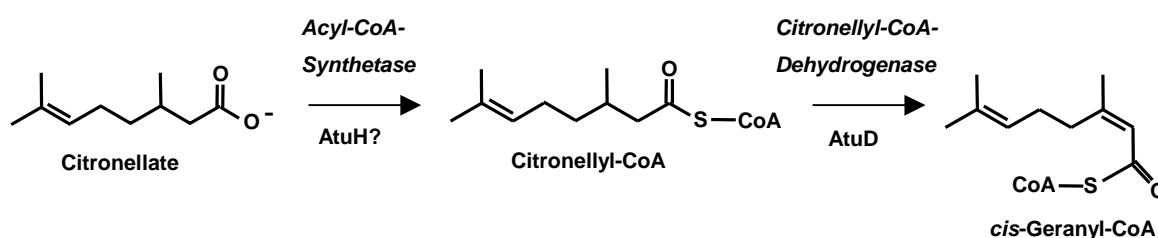


Abb. 2.4: Die Aktivierung der Citronellsäure als CoA-Thioester und die Einführung einer Doppelbindung durch die Citronellyl-CoA-Dehydrogenase

Die Aktivierung der Citronellsäure als CoA-Thioester wird von einer Acyl-CoA-Synthetase katalysiert. AtuH ist als potentielle Acyl-CoA-Synthetase annotiert und könnte diesen Schritt katalysieren. Allerdings zeigte eine Mutation in diesem Gen, bei der pKnockout-G (WINDGASSEN ET AL., 2000) in dieses Gen integriert wurde, keine Auswirkung auf den Phänotyp der Mutante (FÖRSTER-FROMME ET AL., 2006). Jedoch kann deshalb nicht ausgeschlossen werden, daß AtuH an dieser Reaktion beteiligt ist. Vielmehr kann vermutet werden, daß die Aktivierung der Citronellsäure als Thioester auch von weiteren, eventuell konstitutiv vorhandenen Acyl-CoA-Synthetasen katalysiert werden kann. Im Genom von *P. aeruginosa* PAO1 sind vier

nicht näher klassifizierte Synthetasen annotiert (PA3299, PA3300, PA3568, PA3924).

Nach der Aktivierung der Citronellsäure zum CoA-Thioester wird eine Doppelbindung eingeführt und Geranyl-CoA entsteht. Diese Reaktion wird von einer Acyl-CoA-Dehydrogenase katalysiert. Im *atu*-Gencluster ist ein Gen vorhanden, *atuD*, das für eine potentielle FAD-abhängige Acyl-CoA-Dehydrogenase codiert. Des weiteren konnte PA1535, eine weitere potentielle Acyl-CoA-Dehydrogenase, in Experimenten mit 2-D-Gelelektrophorese als spezifisch beim Wachstum mit azyklischen Terpenen als C-Quelle exprimiert, identifiziert werden (siehe 2.2.2). Vergleiche der Aminosäuresequenzen beider Enzyme mit Datenbanken und Literatur (DJORDJEVIC ET AL., 1995) deuteten auf konservierte Aminosäuren zur Bindung von FAD bei *AtuD* und PA1535 hin. Außerdem werden beide Proteine den „long chain“ Acyl-CoA-Dehydrogenasen zugeordnet.

Eine Mutation in *atuD*, bei der das Plasmid pKnockout-G (WINDGASSEN ET AL., 2000) in dieses Gen integriert wurde, zeigte, daß dieses Gen für den Citronellolabbau sehr wichtig ist. Die Insertionsmutante konnte azyklische Terpene nur noch sehr eingeschränkt verwerten (FÖRSTER-FROMME ET AL., 2006, Tab. 2.3). Eine Mutation in PA1535, bei der ebenfalls pKnockout-G (WINDGASSEN ET AL., 2000) in dieses Gen integriert wurde, verursachte demgegenüber nur eine leichte Beeinträchtigung der Insertionsmutante beim Wachstum mit azyklischen Terpenen als C-Quelle (Tab. 2.3). Auch bei Transposonmutanten in PA1535, die von der *P. aeruginosa* PAO1-Transposonmutantenbank bezogen wurde (JACOBS ET AL., 2003), konnte diese Beeinträchtigung festgestellt werden (Tab. 2.3).

Tab. 2.3: Wachstum von *P. aeruginosa* PAO1 WT und Insertions- und Transposonmutanten auf Terpenoiden, Isovaleriansäure und Succinat

PAO1 Stamm (Quelle)	Glu	IV	CS	GS	Ci	Ge	C	G
Wildtyp ATCC 15692	++	++	++	+	++	+	++	+
<i>ins-atuD</i> (FÖRSTER-FROMME ET AL., 2006)	++	++	-*	-*	-*	-*	-*	-
<i>ins-PA1535</i> (CHATTOPADHYAY, 2007)	++	++	+*	+	+	+	+*	+
Transposon- Mutante PA1535 173 (JACOBS ET AL., 2003)	++	++	+	+	+	+	+-	+
Transposon- Mutante PA1535 428 (JACOBS ET AL., 2003)	++	++	+	+	+	+	+-	+

Legende: Die Mikroorganismen wuchsen 4 Tagen bei 30°C auf Agarplatten mit den entsprechenden C-Quellen. Glu: Glucose, IV: Isovaleriansäure, CS: Citronellsäure, GS: Geranylsäure, Ci: Citronellal, Ge: Geranial, C: Citronellol, G: Geraniol. ++: sehr gutes Wachstum, +: gutes Wachstum, +-: eingeschränktes Wachstum, -: kein Wachstum, *: Einzelkolonien tauchen spontan während des Wachstums auf (evt. Suppressionsmutanten)

Um Aussagen treffen zu können, ob *atuD* für die Citronellyl-CoA-Dehydrogenase codiert, wurde das Gen kloniert, in *E. coli* in Anwesenheit von Riboflavin exprimiert und mittels Affinitätschromatographie als His-Tag-Fusionsprotein aufgereinigt. Um zu überprüfen, in wie weit PA1535 in den Citronellolstoffwechsel involviert ist, wurde mit PA1535 ebenso verfahren. Mit den aufgereinigten Proteinen *AtuD* und PA1535 wurden nun Acyl-CoA-Dehydrogenasetests durchgeführt (CHATTOPADHYAY, 2007, ENGEL & MASSEY, 1971). Die gelbe Farbe der Enzymlösung sowie Spektralanalysen bestätigten das Vorhandensein von FAD als gebundener Cofaktor. Als Substrate für die Enzymtests wurden Citronellyl-CoA, Octanoyl-CoA (eine unverzweigter CoA-Thioester mit der selben Kettenlänge wie Citronellyl-CoA), 5-Methylhex-4-enoyl-CoA

(ein CoA-Thioester aus den β -Oxidationsschritten, die Atu- und Liu-Stoffwechsel verbinden) und Isovaleryl-CoA (ein CoA-Thioester aus dem Liu-Stoffwechselweg) verwendet. Es zeigte sich, daß weder AtuD noch PA1535 mit 5-Methylhex-4-enoyl-CoA oder Isovaleryl-CoA als Substrat meßbare Aktivität zeigten. Bei Citronellyl-CoA als Substrat konnten hohe Aktivitäten sowohl bei AtuD (v_{\max} 850 ± 37 mU/mg) als auch bei PA1535 (v_{\max} 2450 ± 26 mU/mg) festgestellt werden. Des weiteren zeigte es sich, daß AtuD mit einem K_M -Wert von $1,6 \pm 0,3$ μ M hochaffin für Citronellyl-CoA ist. Für PA1535 konnte eine zehnfach geringere Affinität für Citronellyl-CoA mit einem K_M -Wert von $18 \pm 1,1$ μ M festgestellt werden. Octanoyl-CoA als Substrat konnte von AtuD nicht umgesetzt werden. PA1535 dagegen setzte Octanoyl-CoA mit einer v_{\max} von 610 mU/mg um. Der K_M -Wert für Octanoyl-CoA betrug hierbei $130 \pm 9,8$ μ M. Außerdem konnte festgestellt werden, daß eine Zugabe von FAD zu den Enzymtestansätzen keine Steigerung der Aktivität hervorrief. Daraus kann abgeleitet werden, daß der Einbau des Co-Faktors FAD in jedes Molekül AtuD und PA1535 erfolgt ist und die Zugabe von Riboflavin ins Medium ausreichte, um genügend FAD herzustellen.

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, daß es sich bei AtuD um die physiologische Citronellyl-CoA-Dehydrogenase handelt. PA1535 stellt vermutlich eine Acyl-CoA-Dehydrogenase mit Spezifität für längerkettige Acyl-CoA-Thioester dar, wobei methylverzweigte CoA-Thioester ebenfalls umgesetzt werden.

2.5 Die Carboxylierung von Geranyl-CoA und die darauffolgende Hydratisierung

Die Geranyl-CoA-Carboxylase ist das Schlüsselenzym des Citronellolstoffwechsels. Sie katalysiert unter ATP-Verbrauch die Carboxylierung der β -ständigen Methylgruppe, die dadurch im weiteren Verlauf des Stoffwechsels nach Hydratisierung der Doppelbindung am selben C-Atom als Acetat abgespalten werden kann (Abb. 2.5). Die Reaktion der Hydratisierung wird vermutlich von AtuE katalysiert.

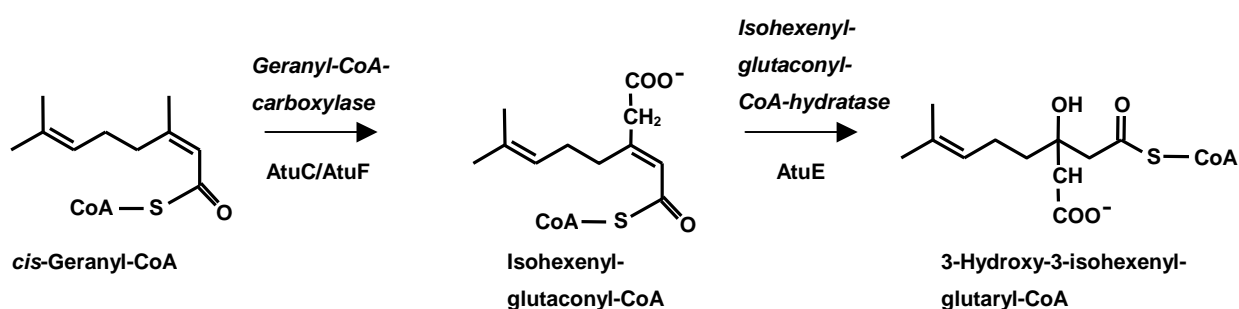


Abb. 2.5: Die Carboxylierung von Geranyl-CoA durch die Geranyl-CoA-Carboxylase und die darauffolgende Hydratisierung durch die Isohexenyl-glutaconyl-CoA-hydratase

In den Arbeiten von SEUBERT wurde die Geranyl-CoA-Carboxylase von *P. citronellolis* aufgereinigt und charakterisiert und dabei festgestellt, daß die Geranyl-CoA-Carboxylase durch das Wachstum mit Citronellol als C-Quelle induziert wird und nur *cis*-Geranyl-CoA als Substrat akzeptiert (SEUBERT ET AL., 1963). Bei *P. aeruginosa* PAO1 konnte ebenfalls gezeigt werden, daß die Geranyl-CoA-Carboxylase ein beim Wachstum mit Isoprenoiden als C-Quelle induziertes Enzym ist (HÖSCHLE ET AL., 2005). Ferner konnten mit Rohextrakten von *P. aeruginosa* PAO1-Zellen Aktivitäten der Geranyl-CoA-Carboxylase gemessen werden (FÖRSTER-FROMME ET AL., 2006).

In dieser Arbeit wurden mit Rohextrakten von *P. citronellolis* und *P. citronellolis ins-atuA* (siehe 2.2.1) Aktivitäten der Geranyl-CoA-Carboxylase gemessen. Bei der Herstellung der Mutante wurde darauf geachtet, daß der auf dem integrierten Plasmid liegende, in *P. aeruginosa* PAO1 konstitutive *lac*-Promoter (WINDGASSEN ET AL., 2000), in Leserichtung von *atuA* liegt und somit die folgenden Gene konstitutiv abgelesen werden, die Mutation also keine „Downstream-Effekte“ nach sich zieht.

Die Stämme wuchsen mit Citronellsäure, Isovaleriansäure und Glucose als C-Quelle, bzw. wurden im Falle der *ins-atuA*-Mutante mit Citronellsäure induziert. Bei *P. citronellolis* konnte in Rohextrakten von mit Citronellsäure gewachsenen Zellen eine spezifische Aktivität der Geranyl-CoA-Carboxylase von 28 mU/mg bestimmt werden. Die Werte in den Rohextrakten der mit Glucose und Isovaleriansäure gewachsenen Zellen lagen unter der Nachweisgrenze von 2 mU/mg. Bei der Insertionsmutante in *atuA* konnte in allen drei Rohextrakten eine spezifische Aktivität der Geranyl-CoA-Carboxylase von ~10 mU/mg festgestellt werden. Mit diesen Ergebnissen konnte bestätigt werden, daß die Geranyl-CoA-Carboxylase bei *P. citronellolis* ein durch Isoprenoide als C-Quelle induziertes Enzym ist. Des weiteren wurde festgestellt, daß der *lac*-Promoter wie in *P. aeruginosa* PAO1 auch in *P. citronellolis* konstitutiv ist. Dies zeigten die konstitutiven Geranyl-CoA-Carboxylase-Aktivitäten bei der *ins-atuA*-Mutante.

2.6 Die Abspaltung von Acetat durch die 3-Hydroxy-3-iso-hexenyl-glutaryl-CoA:acetat-Lyase

Im weiteren Verlauf des Stoffwechsels wird 3-Hydroxy-3-iso-hexenyl-glutaryl-CoA in ein Molekül Acetat und einen β -Ketoacyl-CoA-Thioester, dem 7-Methyl-3-oxo-6-octenoyl-CoA, gespalten. Diese Reaktion wird von der 3-Hydroxy-3-iso-hexenyl-glutaryl-CoA:acetat-Lyase katalysiert (Abb. 2.6).

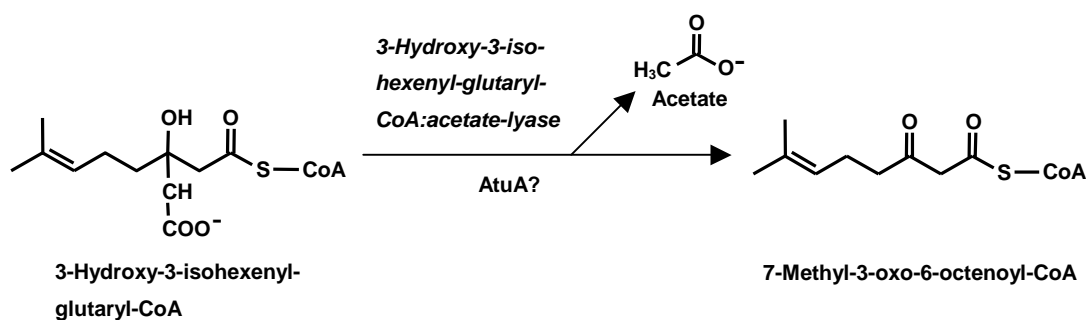


Abb. 2.6: Die Abspaltung von Acetat aus 3-Hydroxy-3-iso-hexenyl-glutaryl-CoA durch die 3-Hydroxy-3-iso-hexenyl-glutaryl-CoA:acetat-Lyase

SEUBERT konnte feststellen, daß diese Lyase bei *P. citronellolis* hochspezifisch für die aus Geranyl-CoA und Farnesyl-CoA gebildeten Hydroxyderivate ist und an der

Spaltung des niedrigeren Homologen (3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA) im weiteren Verlauf des Isoprenoidabbaus nicht beteiligt ist (SEUBERT & FASS, 1964a). Diese Befunde wurden durch gekoppelte Enzymtests, an denen neben der aufgereinigten Lyase die Geranyl-CoA-Carboxylase und die Isohexenyl-glutaconyl-CoA-hydratase beteiligt waren, erbracht.

atuA ist das einzige Gen des *atu*-Genclusters, dem keine potentielle Funktion zugeordnet werden kann. Eine Mutation in *atuA*, bei der pKnockout-G (WINDGASSEN ET AL., 2000) in das Gen integriert wurde, führt zum Verlust der Befähigung zum Citronellolabbau sowohl in *P. aeruginosa* PAO1 als auch in *P. citronellolis*. *atuA* ist also essentiell für den Citronellolabbau. Bei der Einführung der Mutation konnten „Downstream“-Effekte durch die Orientierung des auf p-Knockout-G liegenden, in *Pseudomonas* konstitutiven *lac*-Promoters in die Leserichtung des Gens vermieden werden. Die 3-Hydroxy-3-isohexenyl-glutaryl-CoA:acetat-Lyase ist ein sehr spezielles Enzym und bisher nur bei SEUBERT beschrieben worden. Deshalb sind auch keine Protein- oder Gensequenzen dieses Enzyms bekannt. So liegt die Vermutung nahe, daß *AtuA* die 3-Hydroxy-3-isohexenyl-glutaryl-CoA:acetat-Lyase darstellt. In der Doktorarbeit von NADINE RANDEL aus der Arbeitsgruppe soll die Funktion von *atuA* experimentell geprüft werden.

2.7 Die β -Oxidation

Die β -ständige Methylgruppe im Citronellol verhindert zunächst, daß Citronellol in den Fettsäureabbau eingehen kann. Durch die Carboxylierung dieser Methylgruppe durch die Geranyl-CoA-Carboxylase und anschließender Hydratisierung durch die Isohexenyl-glutaconyl-CoA-Hydratase, kann durch die 3-Hydroxy-3-isohexenyl-glutaryl-CoA:Acetat-Lyase Acetat abgespalten werden. Das resultierende 7-Methyl-3-oxo-6-octenoyl-CoA kann nun durch Reaktionen analog zur β -Oxidation bis zum 3-Methylcrotonyl-CoA abgebaut werden. Dabei werden zwei Moleküle Acetyl-CoA frei (Abb 2.7). Die β -Oxidation stellt die Verbindung zwischen *Atu*- und *Liu*-Stoffwechselweg dar.

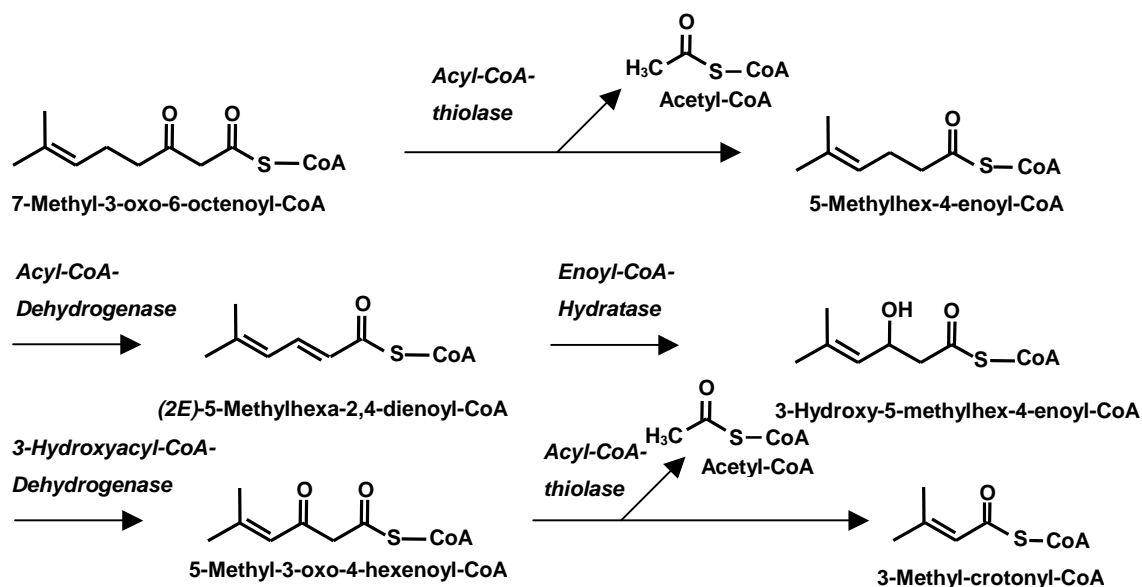


Abb. 2.7: Die Reaktionen der β -Oxidation vom 7-Methyl-3-oxo-6-octenoyl-CoA zum 3-Methyl-crotonyl-CoA unter Abspaltung von zwei Molekülen Acetyl-CoA im Citronellolabbau

Die Gene für die Enzyme, die diese Reaktionen katalysieren, sind bisher nicht bekannt. In der Studienarbeit von B. HANDKE (2007) wurde untersucht, ob *atuB* eine Rolle bei der Dehydrogenierung der CoA-Ester 5-Methylhex-4-enoyl-CoA und 3-Hydroxy-5-methylhex-4-enoyl-CoA spielen könnte. Um diese Annahme zu überprüfen, wurden diese CoA-Ester synthetisiert und Enzymtests mit in *E. coli* exprimierten *AtuB* durchgeführt. Leider konnte keine Acyl-CoA-Dehydrogenase-Aktivität für *AtuB* festgestellt werden. Vermutlich werden die Reaktionen dieser β -Oxidation von Enzymen des Fettsäureabbaus katalysiert. Von Seubert konnten Enzyme des Fettsäureabbaus nachgewiesen werden (SEUBERT & FASS, 1964a). Dabei könnten Gene und Genprodukte des mittels 2-D-Gelelektrophorese identifizierten, in den Citronellolstoffwechsel involvierten *ato*-Genclusters beteiligt sein (siehe 2.2.2). Dieser Gencluster besteht aus 5 Genen. PA1998 wird als potentieller Regulator annotiert, PA1999 und PA2000 stellen die beiden Untereinheiten einer potentiellen Acyl-CoA Transferase dar, PA2001 eine potentielle Acetoacetyl-CoA-Thiolase und PA2002 ein hypothetisches Protein. Wie genau diese Gene in den Citronellolstoffwechsel involviert sind, ist allerdings noch unklar.

2.8 Der Übergang in den Leucinstoffwechsel

Das Endprodukt 3-Methyl-crotonyl-CoA der Reaktionsfolge analog zur β -Oxidation, welche die Verbindung zwischen Atu- und Liu-Stoffwechsel darstellt, geht nun in den Leucinstoffwechsel ein (Abb. 2.8).

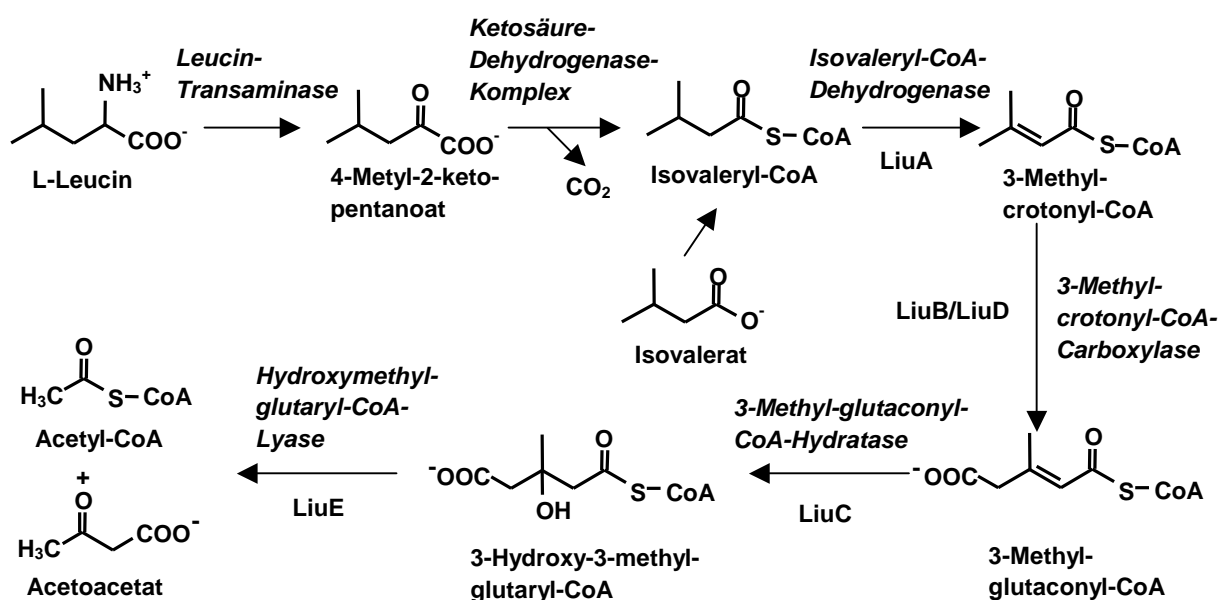


Abb. 2.8: Der Abbau von Leucin

3-Methyl-crotonyl-CoA besitzt eine β -ständige Methylgruppe, die den weiteren Abbau durch β -Oxidation verhindert. In einer Reaktionsfolge analog zum Abbau des Geranyl-CoA wird nun 3-Methyl-crotonyl-CoA zu Acetoacetat und Acetyl-CoA abgebaut. Zuerst wird die β -ständige Methylgruppe carboxyliert. Diese Reaktion wird von der 3-Methyl-crotonyl-CoA-Carboxylase katalysiert. Darauf folgt Hydratisierung am selben C-Atom, an das auch die nun carboxylierte Methylgruppe gebunden ist. Diese Reaktion wird von der 3-Methylglutaconyl-CoA-Hydratase katalysiert. Abschließend erfolgt die von der Hydroxy-methyl-glutaryl-CoA-Lyase katalysierte Spaltung von 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA in Acetoacetat und Acetyl-CoA. L-Leucin geht in den Stoffwechsel ein, indem zuerst die Aminogruppe durch eine Ketogruppe ausgetauscht wird. Diese Reaktion wird von einer Transaminase katalysiert, die für verzweigt-kettige Aminosäuren spezifisch ist. Mit Hilfe des Ketosäure-Dehydrogenase-Komplexes, der spezifisch für verzweigt-kettige Aminosäuren ist, wird 4-Methyl-2-keto-pentanoat decarboxyliert und als Thioester

aktiviert. In das entstandene Isovaleryl-CoA wird dann mit Hilfe der Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase eine Doppelbindung eingeführt.

Bereits SEUBERT postulierte, daß der Isoprenoidabbau bei *P. citronellolis* auf der Stufe des 3-Methyl-crotonyl-CoAs in den Leucinstoffwechsel eingeht (SEUBERT & FASS, 1964a) und stellte fest, daß im Leucinstoffwechsel eine weitere Lyase zusätzlich zur 3-Hydroxy-3-iso-hexenyl-glutaryl-CoA:acetate-lyase beteiligt sein mußte. Des weiteren wurde festgestellt, daß der Umsatz von 3-Methyl-crotonyl-CoA und somit die Expression der in den Abbau von 3-Methyl-crotonyl-CoA involvierten Enzyme von der zum Wachstum verwendeten C-Quelle weitgehend unabhängig ist. Dies wurde festgestellt, indem in Reaktionsansätzen, die unter anderem 3-Methyl-crotonyl-CoA, Rohextrakt von mit Glucose gewachsenen Zellen und radioaktivradioaktiv markiertes CO₂ enthielten, im Endprodukt Acetoacetat die Radioaktivität nachgewiesen werden konnte. Diese Aussage steht im Widerspruch zu neueren Erkenntnissen. MASSEY ET AL. konnten bei *P. putida* nachweisen, daß die Expression der 3-Methyl-crotonyl-CoA-Carboxylase, der 3-Methyl-glutaconyl-CoA-Hydratase sowie der 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Lyase beim Wachstum auf Leucin und auch Isovaleriansäure induziert wird (MASSEY ET AL., 1974). Des weiteren wurde festgestellt, daß die Enzyme, welche die Reaktionen von Leucin zu 3-Methyl-crotonyl-CoA katalysieren, konstitutiv exprimiert werden. HECTOR ET AL. konnten feststellen, daß die Expression der 3-Methyl-crotonyl-CoA-Carboxylase bei *P. citronellolis* beim Wachstum mit Leucin und Isovaleriansäure, aber auch mit Citronell- oder Geranylensäure als C-Quelle induziert wird (HECTOR & FALL, 1976). Es konnte außerdem dargelegt werden, daß die 3-Methyl-crotonyl-CoA Carboxylase aus einer A-Untereinheit und einer biotinhaltigen B-Untereinheit besteht und eine A₄B₄-Struktur besitzt. In neuerer Zeit konnte ein Gencluster in *P. aeruginosa* PAO1 identifiziert werden, das Enzyme des Leucinabbaus codiert, das *liu*-Gencluster (DIAZ-PEREZ ET AL., 2004, HÖSCHLE ET AL., 2005, siehe 2.2.1). Des weiteren konnten Aktivitäten der Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase mit Proteinrohextrakten gemessen werden (FÖRSTER-FROMME ET AL., 2006). Außerdem konnten Proteine des Liu-Stoffwechsels in Proteinrohextrakten von *P. aeruginosa* PAO1-Zellen, die mit Isovaleriansäure und azyklischen Terpenen als C-Quelle gewachsen waren, mittels 2-D-Gelelektrophorese nachgewiesen werden (FÖRSTER-FROMME ET AL., 2006).

Bei *P. aeruginosa* PAO1 wurde *liuA* als potentielle Acyl-CoA-Dehydrogenase annotiert und katalysiert vermutlich die Dehydrogenierung von Isovaleryl-CoA. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde *liuA* in dieser Arbeit kloniert, in *E. coli* in Anwesenheit von Riboflavin exprimiert und mittels Affinitätschromatographie als His-Tag-Fusionsprotein aufgereinigt. Mit dem aufgereinigten LiuA wurden Acyl-CoA-Dehydrogenasetests analog zu denen für die Citronellyl-CoA-Dehydrogenase durchgeführt (siehe 2.4). Es zeigte sich, daß LiuA, das sehr viel stärker als AtuD exprimiert wurde, nicht in jedes Enzymmolekül den Co-Faktor FAD eingebaut hatte. Durch Zugabe von FAD zu den Enzymtestansätzen konnte dieser Mangel behoben werden. Als Substrate für die Enzymtests wurden wie bei den Tests für AtuD Citronellyl-CoA, Octanoyl-CoA, 5-Methylhex-4-enoyl-CoA und Isovaleryl-CoA verwendet. Es konnte festgestellt werden, daß für LiuA mit Citronellyl-CoA, Octanoyl-CoA und 5-Methylhex-4-enoyl-CoA keine Aktivität nachgewiesen werden konnte. Isovaleryl-CoA hingegen wurde mit hoher Spezifität (K_M -Wert $2,2 \pm 0,4 \mu\text{M}$) und Geschwindigkeit (v_{max} $1620 \pm 56 \text{ mU/mg}$) umgesetzt. Diese Ergebnisse zeigen, daß *liuA* für die Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase codiert und LiuA eine hohe Substratspezifität aufweist.

Anhand des postulierten Stoffwechsels (siehe Abb. 1.2) wurde erwartet, daß eine Mutation in *liuA*, bei der das Gen durch Integration des Plasmids pKnockout-G (WINDGASSEN ET AL., 2000) inaktiviert wurde, bewirkt, daß die Mutante nicht mehr mit Leucin und Isovaleriansäure als C-Quelle wachsen kann, aber weiterhin Isoprenoide verwerten kann. Bei der Herstellung der Mutante wurde darauf geachtet, daß der auf dem integrierten Plasmid liegende, in *P. aeruginosa* PAO1 konstitutive *lac*-Promoter (WINDGASSEN ET AL., 2000), in Leserichtung von *liuA* liegt und somit die folgenden Gene konstitutiv abgelesen werden, die Mutation also keine schwer wiegenden „Downstream“-Effekte nach sich ziehen wird. Um so erstaunlicher war, daß die Insertionsmutante weder Isovaleriansäure und Leucin noch Isoprenoide verwerten konnte. Allerdings konnte mittels Western Blot Analysen gezeigt werden, daß die Methyl-crotonyl-CoA-Carboxylase, zumindest deren Biotin-haltige Untereinheit, in der *liuA*-Insertionsmutante weiterhin exprimiert wird. Diese Tatsache legt den Schluß nahe, daß auch die Hydratase und Lyase exprimiert werden sollten und der Abbau von Isoprenoiden möglich sein sollte. Bei mit Citronellsäure induzierten Zellen der

ins-liuA-Mutante wurde weiterhin, wenn auch schwächer als beim Wildtyp, die Geranyl-CoA-Carboxylase exprimiert und somit werden vermutlich auch alle weiteren Proteine des Atu-Stoffwechselweges exprimiert (Abb. 2.9).

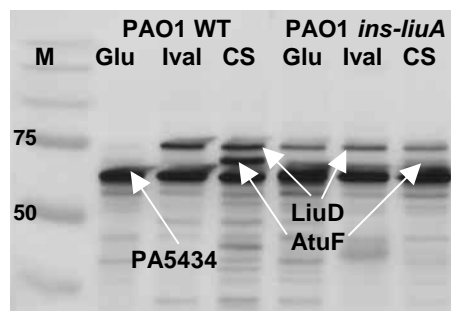


Abb. 2.9: Western Blot-Analyse (Nachweis von Biotin-haltigen Proteinen) von Rohextrakten von *P. aeruginosa* PAO1 Wildtyp und *ins-liuA*. LiuD: Biotin-haltige Untereinheit der MCCase. AtuF: Biotin-haltige Untereinheit der GCCase. Glu: Glucose, Ival: Isovaleriansäure, CS: Citronellsäure. M: Markerproteine in [kDa]. Das konstitutiv auftretende Protein wurde als PA5434 (putative acetyl-CoA carboxylase subunit) identifiziert.

Eine ähnliche Beobachtung wurde anhand einer chemisch erzeugten *P. putida* Mutante beschrieben (MASSEY ET AL., 1974). Diese Mutante hatte die Befähigung mit Isovaleriansäure und Leucin als C-Quelle zu wachsen verloren. Die Autoren vermuteten, daß die 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA-Lyase oder die 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase von der Mutation betroffen war, konnten aber noch Aktivität, wenn auch zum Wildtyp deutlich reduziert, beider Enzyme nachweisen, wenn die Mutante mit Isovaleriansäure und L-Glutamat als C-Quelle gewachsen war. Des weiteren vermuteten sie, daß eventuell auch die Acyl-CoA-Dehydrogenase, also die Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase, betroffen sein könnte. Von DIAZ-PEREZ ET AL. wurde postuliert, daß *liuRA* und *liuBCDE* voneinander unabhängig exprimiert werden (DIAZ-PEREZ ET AL., 2004) und vermutlich die Expression von LiuA die Expression von LiuB, LiuC und LiuD hemmt. Allerdings konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß LiuA gleichzeitig mit LiuB und LiuC exprimiert wird (FÖRSTER-FROMME ET AL., 2006). Es konnten auch bei Untersuchungen mit der DNA-Analysesoftware GeneQuest von DNASTar in der intergenischen Region zwischen *liuA* und *liuB* keine Strukturen wie inverted repeats oder eine potentielle TATA-Box gefunden werden, die auf einen weiteren Transkriptionsstartpunkt hindeuten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß das *liu*-Gencluster als eine Einheit transkribiert

wird. Warum nun allerdings eine Mutation in *liuA* trotz konstitutiver Expression der 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase und vermutlich auch der Hydroxymethyl-glutaryl-CoA-Lyase und 3-Methyl-glutaconyl-CoA-Hydratase und Expression von Atu-Proteinen bei Induktion mit Citronellsäure solche Einschränkungen beim Wachstum auf Isoprenoiden nach sich zieht, bleibt unerklärlich. Möglicherweise hat das Genprodukt von LiuA regulatorische Effekte. Unter Umständen reicht aber auch die konstitutive Expression der weiteren Liu-Proteine nicht aus. Eine Komplementation der *ins-liuA*-Mutante mit einem auf einem Plasmid liegenden intakten *liuA* wäre eine Möglichkeit zu überprüfen, ob das Vorhandensein von *liuA* und dessen Genproduktes ausreichen würde, um die von der Insertion hervorgerufenen Effekte wieder rückgängig zu machen.

2.9 Der weitere Abbau der Endprodukte des Atu- und Liu-Stoffwechsels – der Übergang in den Glyoxylatstoffwechsel

Bei Experimenten, bei denen Transposonmutanten von *P. citronellolis* hergestellt wurden, konnten zwei Transposonmutanten identifiziert werden, die nicht mehr befähigt waren, mit azyklischen Terpenen als alleiniger C-Quelle zu wachsen. Es stellte sich heraus, daß bei einer Mutante (Mutante 19-1-1) das Transposon in ein Gen, das sehr hohe Identität (74%) zum *mgoB*-Gen von *P. aeruginosa* PAO1 aufwies, und bei der anderen Mutante (Mutante 27-1-1) in die Promoterregion des selben Genes integriert war (FÖRSTER-FROMME & JENDROSSEK, 2005). Dieses Gen, *mgoB*, codiert für die Malat:quinone Oxidoreduktase. Dieses Enzym wurde bei *P. aeruginosa* ATCC 17933 als essentiell für das Wachstum mit Ethanol und Acetat als alleiniger C-Quelle identifiziert (KRETZSCHMAR ET AL., 2002). Des weiteren wurde festgestellt, das die Malat:quinone Oxidoreduktase in den Glyoxylatstoffwechsel involviert ist. Bei weiteren Untersuchungen mit den *P. citronellolis*-Transposonmutanten konnte festgestellt werden, daß diese auch Acetat nicht (Mutante 19-1-1), bzw. nur schlecht verwerten können (Mutante 27-1-1). Des weiteren konnten hohe Enzymaktivitäten der MQO beim Wachstum des *P. citronellolis*-Wildtyps mit azyklischen Terpenen und Isovaleriansäure als alleiniger C-Quelle bestimmt werden. Somit kann festgestellt werden, daß die MQO für den

Citronellolstoffwechsel und die Verwertung von Acetat bei *P. citronellolis* und höchstwahrscheinlich auch bei *P. aeruginosa* PAO1 essentiell ist und offensichtlich nicht durch eine Malatdehydrogenase ersetzt werden kann.

Aus den zuvor beschriebenen Experimenten und Ergebnissen kann geschlossen werden, daß die Endprodukte des Citronellolstoffwechsels, drei Moleküle Acetyl-CoA, ein Molekül Acetat und ein Molekül Acetoacetat, in den Glyoxylatstoffwechsel eingehen. Der Glyoxylatzyklus ist eine Variante des Citratzyklus, der es Bakterien und auch Pflanzen möglich macht, Acetat zu metabolisieren. Wenn Acetat als Energiequelle zur Verfügung steht, wie es beim Abbau von z. B. Fettsäuren, Isoprenen und aliphatischen Alkoholen der Fall ist, werden die Enzyme des Glyoxylatzyklus induziert. Dieser Weg wird gewählt, da beim Wachstum auf Acetat die CO₂-Abspaltungsreaktionen des Citratzyklus umgangen werden müssen, um Zellsubstanz herstellen zu können. Acetyl-CoA geht in den Glyoxylatzyklus ein und bildet mit Oxalacetat Citrat. Diese Reaktion wird von der Citratsynthase katalysiert. Citrat wird mit Hilfe der Aconitase zu Isocitrat, das von der Isocitratlyase, einem Schlüsselenzym des Glyoxylatstoffwechsels, zu Succinat und Glyoxylat gespalten wird. Hier ergibt sich eine zweite Möglichkeit zum Eingang von Acetyl-CoA in den Stoffwechsel. Unter Abspaltung von CoA und Zufuhr von H₂O wird aus Acetyl-CoA und Glyoxylat mit Hilfe der Malatsynthase, dem zweiten Schlüsselenzym des Glyoxylat-Stoffwechsels, Malat gebildet. Succinat wird über Fumarat zu Malat. Nun schließt sich der von der Malat:quinon Oxidoreduktase katalysierte Schritt an, bei dem die beiden entstandenen Malatmoleküle zu zwei Oxalacetat umgewandelt werden. Eines davon kann für die Biosynthese genutzt werden, das zweite wieder mit Acetyl-CoA zu Citrat verschmelzen.

Die Beteiligung der Isocitratlyase am Citronellolstoffwechsel konnte durch Experimente mit 2-D-Gelelektrophorese bei *P. aeruginosa* PAO1 gezeigt werden. Ein Spot im Proteinmuster von Zellen, die mit azyklischen Terpenen als C-Quelle gewachsen waren, der aber in Proteinmustern von Zellen, die mit Succinat als C-Quelle gewachsen waren, nicht gefunden wurde, konnte als PA2643, eine potentielle Isocitratlyase, identifiziert werden. Des Weiteren wurden zwei potentielle Aconitasen (PA1562 und PA1787) identifiziert (FÖRSTER-FROMME ET AL., 2006, siehe auch 2.2.2).

Die Beteiligung der Isocitratlyase und somit des Glyoxylatstoffwechsels am Citronellolstoffwechsel bei *P. aeruginosa* PAO1 konnte vor kurzem durch weitere Untersuchungen einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt werden (DIAZ-PEREZ ET AL., 2007).

Aus diesen Erkenntnissen kann geschlossen werden, daß sowohl bei *P. citronellolis* als auch bei *P. aeruginosa* PAO1 die Endprodukte des Citronellolstoffwechsels in den Glyoxylatstoffwechsel eingehen und nicht nur die Malat:quinone Oxidoreduktase sondern auch die Isocitratlyase Schlüsselenzyme darstellen.

2.10 Die Regulation des Citronellolstoffwechsels

Aminosäure-Sequenzvergleiche von *AtuR* mit Datenbanken haben darauf hingewiesen, daß *AtuR* vermutlich ein Repressor der TetR-Familie ist. Aufgrund der Nachbarschaft zum *atu*-Gencluster wurde angenommen, daß *AtuR* den Repressor des *atu*-Genclusters darstellt. Proteine dieser Familie besitzen zwei Bindestellen. Die eine Bindestelle ist für die Anlagerung des Regulatorproteins an die Promoteregion der zu regulierenden Gene zuständig, und so wird die Transkription der Gene verhindert. Die zweite Bindestelle kann Induktormoleküle binden. Bindet ein Induktor an das Regulatorprotein, ändert dieses seine Konformation, löst sich von der DNA ab und die Promoterregion liegt frei, worauf die Gene abgelesen werden können. Außerdem liegen Regulatoren der TetR-Familie als Dimere vor (RAMOS ET AL., 2005).

Die Repressorfunktion von *atuR* konnte durch eine Insertion in diesem Gen gezeigt werden. Dabei wurde *atuR* durch die Integration des Plasmids pKnockout-G (WINDGASSEN ET AL., 2000) inaktiviert. Bei dieser Insertionsmutante konnte durch Western-Blot-Analyse, bei der biotinhaltige Proteine nachgewiesen wurden, gezeigt werden, daß *AtuF*, die biotinhaltige Untereinheit der Geranyl-CoA-Carboxylase, konstitutiv exprimiert wurde. *AtuF* konnte nämlich auch in Proteinrohextrakten von Zellen der *atuR*-Insertionsmutante, die mit C-Quellen wie Glucose, die im Wildtyp keine Transkription des *atu*-Genclusters und damit auch keine Expression der *Atu*-Proteine hervorrufen, durch Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden. Aus diesen Beobachtungen wurde geschlossen, daß das gesamte *atu*-Gencluster konstitutiv transkribiert und translatiert wird.

Bei der Analyse des intergenischen Bereich zwischen den Genen *atuR* und *atuA* wurden potentielle -10 und -35-Regionen und inverted repeats, invertierte, spiegelbildlich angeordnete Sequenzen, gefunden. Diese inverted repeats sind typische Bindestellen für Regulationsproteine (Abb. 2.10).

```

TCAGGCGTTCTTGATCACCAGCGCCAGGGCCTCCTCGGCGAGCTGGTCGAGACTCATCGGTCCTTCCGGACGGAA
CCAGGTTGGTGGTCCAGGACAGCGCGCCGGTGAGGAAGCGCCGAGGATGAACGGATCGCCCTGGCAGTAGCCGGC
CAGC Stopcodon CAGCACGTTCGAGCCACATCTGCTCGTAGATGTCGCGCAGGCCGAGGATGTACGCCTGGCC
TTCG atuR AGGCCACTCGTAGACCAGCACCGCCATCGCCTCGCCGGTGCCGCC Startcodon atuR
CTCGCAGCGGATCAGTCCCAGCACCCGCTCGCGCAGGTCTCGGCGTCGGCCAGGGCGGC
GTTGTAGAGGATGGTCTCTTCCATCACCGAGCGCAGGATCTCGTCTTTGCTCTTGAAGTGATGGAAGATGCTGCC
CGACTGGATGCCACCAGCGCTGGCCAGGTTCGCGCACCGTGGTTCGTTTCGTAGCCTTTGCTGCGGAACAGCGGGC
GGCGGTCTGCAGCAGCTTGCCGCGGGCGCTTTCCGGATCGGTGAGCTGTCCGGTAGCCACCAGCTCCAGCATCAC
TTCCCGGGCTTTCTGATCGTCCAACGCTGAGTACCCCTTTTCCGGATCGTTCGGCGGCTCGGTGCCGCTCATCCGC
GCGCCCGGGCGCTCCGTATTTGCCGAGCGGCCCTCGGGATTGCCCCGCAAGTGCTTGTTCGGCATTTCATGAAATGTA
TGCCTGCGAAGACGACCGAGCAAGCGCTTGGTAACAGCCGAGAACGGATTTGTTTCTGCCCTTTCTCAACC
CGCCTTGGTAATGTCGCCCCACACTTCCGCGTACGGGTCAAGAACAATGCAAAAGACCCACGCATCGG
CTGACCTCGGCCTTTGGGGCGACACCTGCACCCGCGGCCGCGCAGCTGGTTCGCGGCGCGCCCTGGACTACCT
GGTGTTCGACTACCTGGCCGAGATCACCATGTCGATCATGGCCGGCGCCCGCCTGAAACAAGGCGGCGGCTA
CGCCACCGATTTTCGTGAGGTCCTCGCACCGTGTCTGGGCGAGATCGCGGAGAAGAAGAT -35-Region
Inverted Repeat -10 Region Inverted Repeat Startcodon atuA 3AAGGCCGGGGTGCAGTTGAA
3ATCCCGGCATCCGCGAGATGTT
CAGCGACGCGCCTTTCCCGCCGATGTGCGTCTCGCTCAACGCCTACCTCGGCGCACCGGGCATCGTCGAGGCCCT
GCGCCTGGGCGCGGACATCGTGATCACCGGCCGGGTGGTTCGACAGCGCGGTGGTCAGCGCCGCCCTGGTGCACGA
GTTTCG
    
```

Abb. 2.10: Die Promoterregion des *atu*-Genclusters mit angrenzenden Sequenzbereichen

Um Aussagen treffen zu können, ob und inwieweit die inverted repeats von physiologischer Bedeutung für die Expression der *Atu*-Proteine sind, sollte untersucht werden, ob diese inverted repeats die Bindestelle für *AtuR* sind, welche Induktoren die Bindung lösen und ob *AtuR* ebenfalls wie andere Regulatoren aus der TetR-Familie als Dimer vorliegt. Dafür wurde *atuR* mit Histidin-Tag kloniert und das in *E. coli* exprimierte *AtuR*-Protein aufgereinigt. Das aufgereinigte Protein wurde für Gelshift-Experimente eingesetzt. Solche Experimente beruhen darauf, daß die DNA bei Bindung eines Proteins im Gel langsamer läuft als freie DNA und deshalb ein Shift in der zurückgelegten Wanderungsstrecke sichtbar ist. Dabei wurde auf der einen Seite überprüft, welche Regionen des intergenischen Bereichs zwischen *atuR* und *atuA* für die Bindung essentiell sind und auf der anderen Seite, welche potentiellen Induktoren das Ablösen des Regulatorproteins von seiner Bindungsstelle auslösen.

Um festzustellen, welche DNA-Bereiche für die Bindung essentiell sind, wurden 5 verschiedene PCR-Fragmente amplifiziert. Das erste enthielt den kompletten intergenischen Bereich, beim zweiten fehlte die –10-Region, beim dritten die –10-Region und der erste inverted repeat, beim vierten die –10-Region, der erste inverted repeat und die –35-Region und dem fünften PCR-Fragment fehlten alle vier Elemente. Mit diesen unterschiedlichen Fragmenten wurden Gelshift-Experimente durchgeführt. Beim ersten Fragment konnte ein deutlicher Shift der DNA bei Anwesenheit von AtuR beobachtet werden. Das Fehlen der –10-Region beim zweiten Fragment zeigte keine Auswirkung, und es war ein deutlicher Shift und somit eine Bindung von AtuR an die DNA zu sehen. Sobald allerdings ein inverted repeat fehlte, wurde die Bindung von AtuR an die DNA deutlich schlechter, auch wenn noch ein leichter Shift zu sehen war. Fehlten beide inverted repeats, band AtuR nicht mehr an die DNA. Die –35-Region scheint bei der Bindung nicht essentiell zu sein, denn es konnte kein Unterschied des Bindungsverhaltens zwischen dem dritten und vierten Fragment festgestellt werden. Die inverted repeats sind also essentiell für die Bindung von AtuR an die DNA, die –10- und die –35-Region sind es nicht.

Um festzustellen, welche Induktoren das Ablösen von AtuR von der DNA auslösen, wurde das erste PCR-Fragment verwendet, das den gesamten intergenischen Bereich abdeckt, und zu den Reaktionsansätzen Citronellol, Geraniol, Citronellal, Geranial, Citronellsäure, Geranolsäure, Leucin, 3-Methylcrotonsäure, Isovaleriansäure, Glucose, Farnesol, Phytol, Eucalyptol oder Octanol gegeben. Es zeigte sich, daß Citronellol, Geraniol, Citronellal, Geranial, Citronellsäure, Geranolsäure oder Octanol die Bindung zwischen AtuR und der DNA *in vitro* auflösen und somit *in vitro* Effektoren des *atu*-Stoffwechselweges darstellen. Offensichtlich binden diese Substanzen an AtuR und lösen die oben erwähnte Konformationsänderung aus, worauf sich AtuR von der DNA löst. Leucin, 3-Methylcrotonsäure, Isovaleriansäure, Glucose, Farnesol, Phytol und Eucalyptol beeinflussten hingegen die Bindung von AtuR an die DNA nicht. Citronellol, Geraniol, Citronellal, Geranial, Citronellsäure und Geranolsäure sind Intermediate des Citronellolstoffwechsel, und somit war es nicht überraschend, daß diese Substanzen als Effektoren wirken. Auch wirkten offensichtlich länger-kettige Terpene wie Farnesol und Phytol oder zyklische Terpene wie Eucalyptol und Intermediate wie Leucin, 3-

Methylcrotonsäure, Isovaleriansäure aus Abbauwegen, die mit dem *atu*-Stoffwechselweges verknüpft sind, nicht als Effektoren. Auch Glucose wirkt nicht als Effektor. Unklar war, warum Octanol als Effektor wirkte, da unverzweigte Alkane wie diese Substanz üblicherweise über den Fettsäureabbau metabolisiert werden. Um zu überprüfen, ob der *atu*-Stoffwechselweg auch *in vivo* durch Octanol induziert wird, wurde mit Proteinen von mit Octanol als C-Quelle gewachsenen Zellen Western Blots durchgeführt und wie oben beschrieben biotinhaltige Proteine nachgewiesen. Damit konnte gezeigt werden, daß Octanol *in vivo* weder den *atu*- noch den *liu*-Stoffwechselweg induziert, da weder AtuF, die biotinhaltige Untereinheit der Geranyl-CoA-Carboxylase noch LiuD, die biotinhaltige Untereinheit der 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase, nachzuweisen waren. Längerkettige Terpene wie Phytol und Farnesol wirkten ebenfalls nicht als Induktoren. Da *P. aeruginosa* PAO1 weder mit Farnesol noch mit Phytol als C-Quelle zu wachsen vermag, zielte der Einsatz dieser Substanzen darauf hin festzustellen, ob die Länge der Kette von Bedeutung ist. Offensichtlich ist dies der Fall. Somit wirken also Citronellol, Geraniol, Citronellal, Geranial, Citronellsäure und Geranylsäure als Induktoren und binden an AtuR, das daraufhin offenbar seine Konformation ändert und sich von der DNA ablöst.

Repressoren der TetR-Familie treten als Homodimere auf. Diese Struktur ist für die stabile Bindung des Regulatorproteins an die DNA essentiell, da die eine Untereinheit des Dimers an den einen inverted repeat und die andere Untereinheit an den anderen inverted repeat bindet (RAMOS ET AL., 2005). Um zu überprüfen, ob AtuR im nativen Zustand auch als Dimer auftritt, wie das auch für andere Regulatorproteine aus der TetR-Familie beschrieben wurde, sollte nun die Quartärstruktur von AtuR bestimmt werden. Die Größe des nativen aufgereinigten AtuR-Proteins sollte durch Gelfiltration bestimmt werden. Die verwendete Superdex 75-Säule wurde mit Hilfe des Low Molecular Weight Gelfiltration Calibration Kit (Amersham Biosciences) kalibriert und der Wert für das aufgereinigte AtuR bestimmt. Dabei ergab sich eine Größe von 54 ± 3 kDa. Da die theoretische Größe des getaggenen AtuR-Monomers 26,9 kDa betrug, ergab sich somit, daß AtuR nativ offenbar als Dimer vorliegt.

2.11 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden weitere Gene in *P. aeruginosa* PAO1 zu den bereits zugeordneten Genen der Geranyl-CoA-Carboxylase *atuC/atuF* und der Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase *liuB/liuD* des *atu*- und des *liu*-Genclusters (HÖSCHLE ET AL., 2005) funktionell zugeordnet. Es wurde gezeigt, daß *atuD* für die Citronellyl-CoA-Dehydrogenase codiert und daß das Genprodukt Citronellyl-CoA mit sehr hoher Affinität zu Geranyl-CoA umsetzt. Ferner konnte durch Insertionsmutation gezeigt werden, daß das Gen für den Citronellolabbau essentiell ist. Es wurde auch eine weitere Acyl-CoA-Dehydrogenase, PA1535, die mittels 2D-Gelelektrophorese identifiziert worden war, als spezifisch für längerkettige CoA-Thioester zugeordnet. Des weiteren wurde *atuR*, ein Regulatorgen, das in direkter Nachbarschaft zum *atu*-Gencluster liegt, als Repressor des *atu*-Genclusters identifiziert. Bei einer Insertionsmutante in *atuR* wurde nachgewiesen, daß die Geranyl-CoA-Carboxylase konstitutiv exprimiert wurde und somit die reprimierende Wirkung von *AtuR* verloren gegangen war. Es wurde weiterhin festgestellt, daß *atuR* ein Regulator aus der TetR-Familie ist und nativ als Dimer vorliegt. Citronellol, Geraniol, Citronellal, Geranial, Citronellsäure und Geranylsäure lösten *in vitro* das Ablösen des Regulators von der Promoterregion des *atu*-Genclusters aus und wurden somit als Effektoren des Regulators identifiziert. Des weiteren wurde gezeigt, daß *liuA* für die Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase des Liu-Stoffwechsels codiert. Das Genprodukt *LiuA* setzte Isovaleryl-CoA mit hoher Affinität um und akzeptierte keine längerkettigen CoA-Thioester als Enzymsubstrat. Außerdem wurde gezeigt, daß die Endprodukte des *Atu*- und *Liu*-Stoffwechselweges bei *P. citronellolis* in den Glyoxylatzyklus eingehen (FÖRSTER-FROMME & JENDROSSEK, 2005) und auch das *atu*-Gencluster in *P. citronellolis* vorhanden ist (FÖRSTER-FROMME & JENDROSSEK, 2006).

Die Funktion von *atuA* ist bisher nicht bekannt. Auch weist die Aminosäuresequenz von *AtuA* keine Ähnlichkeiten mit bisher untersuchten Proteinen auf. Es konnte aber gezeigt werden, daß *atuA* für den Citronellolstoffwechsel essentiell ist (FÖRSTER-FROMME ET AL., 2006, FÖRSTER-FROMME & JENDROSSEK, 2006). Eine Insertionsmutante in *atuA* konnte keine Terpenoide mehr umsetzen. *atuA* könnte die 3-Hydroxy-3-iso-hexenyl-glutaryl-CoA:acetate-Lyase codieren. Da die 3-Hydroxy-3-iso-hexenyl-glutaryl-CoA:acetate-Lyase ein sehr spezielles Enzym ist und auch nur

die aus Geranyl-CoA und Farnesyl-CoA gebildeten Hydroxyderivate umsetzt (SEUBERT & FASS, 1964a), ist es nicht überraschend, daß ein ähnliches Enzym in den Datenbanken nicht zu finden ist. Da für alle anderen Gene des *atu*-Genclusters aufgrund von Aminosäuresequenz- und DNA-Sequenzähnlichkeiten zu anderen, bereits untersuchten Proteinen zumindest Funktionen zugeordnet werden können, liegt die Vermutung nahe, daß *atuA* tatsächlich für die außergewöhnliche 3-Hydroxy-3-iso-hexenyl-glutaryl-CoA:acetate-Lyase codiert. In der laufenden Doktorarbeit von NADINE RANDEL soll nun *atuA* funktionell zugeordnet werden.

In *P. aeruginosa* PAO1 wurde *atuE* als potentielle Enoyl-CoA-Hydratase annotiert und codiert vermutlich für die Isohexenyl-glutaconyl-CoA-Hydratase. Auch dieses Enzym soll in der Doktorarbeit von NADINE RANDEL näher untersucht und funktionell zugeordnet werden. *atuB* und *atuG* konnten bisher funktionell nicht zugeordnet werden (FÖRSTER-FROMME ET AL., 2006, HANDKE 2007). Beide Gene werden als potentielle Dehydrogenasen annotiert. Die Genprodukten könnten bei der Oxidation der Terpenalkohole zu den Terpensäuren beteiligt sein. Allerdings deuten weitere Untersuchungen darauf hin, daß die Gene für die Oxidation der Terpenalkohole zu den Terpensäuren außerhalb des *atu*-Genclusters zu finden sind (siehe 2.3). *atuH* wurde als potentielle „very-long chain“ Acyl-CoA-Synthetase annotiert und könnte die Aktivierung der Citronellsäure als CoA-Thioester katalysieren. Allerdings zeigte eine Mutation in diesem Gen keine Auswirkungen auf das Wachstum der Mutante im Vergleich zum PAO1 Wildtyp, so daß dieses Gen vermutlich nicht essentiell für den Citronellolstoffwechsel ist. Eine Beteiligung von *atuH* an der Aktivierung der Citronellsäure kann aber deshalb nicht ausgeschlossen werden.

liuC und *liuE* wurden bisher noch nicht funktionell zugeordnet. *liuC* wurde als potentielle Enoyl-CoA Hydratase annotiert und codiert vermutlich für die Methylglutaconyl-CoA-Hydratase. *liuE* codiert vermutlich für die Hydroxymethylglutaryl-CoA-Lyase. Hohe Ähnlichkeiten zu bereits in *P. putida* KT2440 und *P. fluorescens* Pf-5 identifizierten Hydroxymethylglutaryl-CoA-Lyasen bestätigen diese Annahme.

Des Weiteren wurden durch 2D-Gelexperimente weitere, am Citronellolstoffwechsel beteiligte Proteine identifiziert (siehe 2.2.2). Proteine des *ato*-Genclusters, die in *E. coli* am Fettsäureabbau beteiligt sind (JENKINS & NUNN, 1987), könnten die Schritte

der den Atu- mit dem Liu-Stoffwechsel verbindenden β -Oxidation katalysieren. Ferner wurden zwei Gene, PA 2553 und PA2554, des Genclusters von PA2552-PA2557 als am Citronellolstoffwechsel beteiligt, identifiziert. Diese Gene wurden bisher noch nicht untersucht. Ihre annotierte Funktion könnte ebenfalls auf eine Beteiligung an der β -Oxidation hinweisen. PA 2553 ist als eine potentielle Acyl-CoA-Thiolase und PA2554 als eine potentielle „short chain“-Dehydrogenase annotiert. Um dies zu überprüfen, müßten die entsprechenden Gene kloniert und exprimiert werden und Umsatzversuche mit den Intermediaten der β -Oxidation durchgeführt werden. Des weiteren könnten Insertionsmutanten der Gene hergestellt werden und so überprüft werden, ob die *ato*-Gene und die Gene des Genclusters von PA2552-PA2557 für den Citronellolabbau essentiell sind. Des weiteren wurde PA1982, eine potentielle PQQ-abhängige Alkoholdehydrogenase, als am Citronellolstoffwechsel beteiligt, identifiziert. Dieses Protein wurde in Proteinmustern von Zellen, die mit Geraniol, Geranial und Geranylsäure als C-Quelle gewachsen waren, nachgewiesen. Auch konnte ein Quinon-abhängiger Umsatz in Rohextrakten von *P. aeruginosa* PAO1 von Geraniol, Geranial und Citronellal als Enzymsubstrat gezeigt werden. Ob diese Aktivität aber wirklich von PA1982 und nicht von anderen Quinon-abhängigen Enzymen stammt, blieb fraglich. In der laufenden Diplomarbeit von AVA CHATTOPADHYAY soll nun PA1982 in *E. coli* exprimiert werden und dessen Aktivität und Spezifität bezüglich Citronellol, Geraniol, Geranial und Citronellal ermittelt werden. Ferner wurden drei Proteine identifiziert, die vermutlich im Glyoxylatzyklus eine Rolle spielen, PA1562 und PA1787, zwei potentielle Aconitasen und PA2643, eine potentielle Isocitratlyase. Bei *P. citronellolis* wurde bereits gezeigt, daß die Endprodukte des Atu- und Liu-Stoffwechselweges in den Glyoxylatstoffwechsel eingehen (FÖRSTER-FROMME & JENDROSSEK, 2005). Aus der Identifikation dieser weiteren Proteine kann geschlossen werden, daß die Endprodukte des Atu- und Liu-Stoffwechselweges auch bei *P. aeruginosa* PAO1 mit sehr großer Wahrscheinlichkeit in den Glyoxylatstoffwechsel eingehen. Auch konnte gezeigt werden, daß die Isocitratlyase für den Citronellolabbau in *P. aeruginosa* PAO1 essentiell ist (DIAZ-PEREZ ET AL., 2007). Die Aufklärungen der Funktionen der weiteren durch 2D-Gelelektrophorese am Citronellolstoffwechsel beteiligten Proteine bleibt weiteren Forschungen überlassen.

3 Literaturverzeichnis

Aguilar, J. A., Zavala, A. N., Diaz-Perez, C., Cervantes, C., Diaz-Perez, A.L., Campos-Garcia, J. (2006): The *atu* and *liu* clusters are involved in the catabolic pathways for acyclic monoterpenes and leucine in *Pseudomonas aeruginosa*. Appl Environ Microbiol. **72(3)**: 2070-9.

Breitmaier, E. (2005): Terpene: Aromen, Düfte, Pharmaka, Pheromone. 2. Auflage. Wiley-VCH, Weinheim.

Burke, Y. D., Stark, M. J., Roach, S. L., Sen, S. E., Crowell, P. L. (1997): Inhibition of pancreatic cancer growth by the dietary isoprenoids farnesol and geraniol. Lipids. **32(2)**:151-6.

Burke, Y. D., Ayoubi, A. S., Werner, S. R., McFarland, B. C., Heilmann, D. K., Ruggeri, B. A., Crowell, P. L. (2002): Effects of the isoprenoids perillyl alcohol and farnesol on apoptosis biomarkers in pancreatic cancer chemoprevention. Anticancer Res. **22(6A)**:3127-34.

Cantwell, S. G., Lau, E. P., Watt, D. S., Fall, R. R. (1978): Biodegradation of acyclic isoprenoids by *Pseudomonas* species. J. Bacteriol. **135/2**: 324-333.

Carneseccchi, S., Langley, K., Exinger, F., Gosse, F., Raul, F. (2002a): Geraniol, a component of plant essential oils, sensitizes human colonic cancer cells to 5-Fluorouracil treatment. J Pharmacol Exp Ther.: **301(2)**:625-630.

Carneseccchi, S., Bradaia, A., Fischer, B., Coelho, D., Scholler-Giunard, M., Gosse, F., Raul, F. (2002b): Perturbation by geraniol of cell membrane permeability and signal transduction pathways in human colon cancer cells. J Pharmacol Exp Ther.: **303(2)**:711-715.

Carneseccchi, S., Bras-Goncavales, R., Bradaia, A., Zeisel, M., Gosse, F., Poupon, M. F., Raul, F. (2004): Geraniol, a component of plant essential oils, modulates DNA synthesis and potentiates 5-fluorouracil efficacy on human colon tumor xenografts. Cancer Lett.: **215(1)**:53-59.

Chang, M. C. Y., Keasling, J. D. (2006): Production of isoprenoid pharmaceuticals by engineered microbes. Nat Chem Biol **2(12)**:674-81.

Chattopadhyay, A. (2007): Biochemische Untersuchung der Acyl-CoA-Dehydrogenasen im Citronellol-Stoffwechsel. Studienarbeit, Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart

Diaz-Perez, A. L., Zavala-Hernandez, A. N., Cervantes, C., Campos-Garcia, J. (2004): The *gnyRDBHAL* cluster is involved in acyclic isoprenoid degradation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol.* **70(9)**:5102-10.

Diaz-Perez, A. L., Roman-Doval, C., Diaz-Perez, C., Cervantes, C., Sosa-Aguirre, C. R., Lopez-Meza, J. E., Campos-Garcia, J. (2007): Identification of the *aceA* gene encoding isocitrate lyase required for the growth of *Pseudomonas aeruginosa* on acetate, acyclic terpenes and leucine. *FEMS Microbiol Lett.* **269(2)**:309-16.

Diehl, A., von Witzingerode, W., Görisch, H. (1998): Quinoprotein ethanol dehydrogenase of *Pseudomonas aeruginosa* is a homodimer-sequence of the gene and deduced structural properties of the enzyme. *Eur J Biochem.* **257(2)**:409-19.

Djordjevic, S., Pace, C. P., Stankovich, M., T., Kim, J.-J. P. (1995): Three-dimensional structure of butyryl-CoA dehydrogenase from *Megasphaera elsdenii*. *Biochemistry* **34(7)**:2163-71.

Duncan, R. E., Lau, D., El-Sohemy, A., Archer, M. C. (2004): Geraniol and beta-ionone inhibit proliferation, cell cycle progression, and cyclin-dependent kinase 2 activity in MCF-7 breast cancer cells independent of effects on HMG-CoA reductase activity. *Biochem Pharmacol.* **68(9)**:1739-47

Engel, P. C., Massey, V. (1971): The purification and properties of butyrylcoenzymeA dehydrogenase from *Peptostreptococcus elsdenii*. *Biochem J* **125**, 879-887.

Fall, R. R., Hector, M. L. (1977): Acyl-coenzyme A carboxylases. Homologous 3-methylcrotonyl-CoA and geranyl-CoA carboxylases from *Pseudomonas citronellolis*. *Biochemistry* **16(18)**:4000-5.

Förster-Fromme, K. (2004): Molekularbiologische und biochemische Charakterisierung von Mutanten des Citronellolstoffwechsels in *Pseudomonas citronellolis*. Diplomarbeit, Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart.

Förster-Fromme, K., Jendrossek, D. (2005): Malate:quinone oxidoreductase (MqoB) is required for growth on acetate and linear terpenes in *Pseudomonas citronellolis*. *FEMS Microbiol Lett.* **246(1)**:25-31.

Förster-Fromme, K., Höschle, B., Mack, C., Bott, M., Armbruster, W., Jendrossek, D.(2006): Identification of genes and proteins necessary for catabolism of acyclic terpenes and leucine/isovalerate in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol.* **72(7)**:4819-28.

Förster-Fromme, K., Jendrossek, D. (2006): Identification and characterization of the acyclic terpene utilization gene cluster of *Pseudomonas citronellolis*. FEMS Microbiol Lett. **264(2)**:220-5.

Guan, X., Diez, T., Prasad, T. K., Nikolau, B. J., Wurtele, E. S. (1999): Geranoyl-CoA carboxylase: a novel biotin-containing enzyme in plants. Arch Biochem Biophys. **362(1)**:12-21.

Handke, B. (2007): Biochemische Untersuchung der heterolog exprimierten Alkoholdehydrogenase AtuD aus *P. aeruginosa* PAO1. Studienarbeit, Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart.

Harder, J. & Probian, C. (1995): Microbial degradation of monoterpenes in the absence of molecular oxygen. Appl Environ Microbiol **61**, 3804-3808.

Hector, M. L., Fall, R. R. (1976): Multiple acyl-coenzyme A carboxylases in *Pseudomonas citronellolis*. Biochemistry **15(16)**:3465-72.

Heyen, U. & Harder, J. (2000): Geranic acid formation, an initial reaction of anaerobic monoterpene metabolism in denitrifying *Alcaligenes defragrans*. Appl Environ Microbiol **66**, 3004-3009.

Hierro, I., Valero, A., Pérez, P., González, P. Capo, M. M., Montilla, M. P., Navarro, M. C. (2004): Action of different monoterpene compounds against *Anisakis simplex* s.l. L3 larvae. Phytomedicine **11(1)**: 77-82.

Höschle B., Jendrossek, D. (2005): Utilization of geraniol is dependent on molybdenum in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for different metabolic routes for oxidation of geraniol and citronellol. Microbiology **151**: 2277-83.

Höschle, B., Gnau, V., Jendrossek, D. (2005): Methylcrotonyl-CoA and geranyl-CoA carboxylases are involved in leucine/isovalerate utilization (Liu) and acyclic terpene utilization (Atu), and are encoded by *liuB/liuD* and *atuC/atuF*, in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology **151**: 3649-56.

Höschle, B. (2006): Identifizierung zweier Gencluster (*atuABCDEFGH*, *liuRABCDE*) in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 und deren funktionelle Analyse im Metabolismus methylverzweigter Verbindungen. Doktorarbeit, Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart.

Hylemon, P. B. & Harder, J. (1998): Biotransformation of monoterpenes, bile acids, and other isoprenoids in anaerobic ecosystems. FEMS Microbiol Rev **22**, 475-488.

Izumi, S., Takashima, O., Hirata, T. (1999): Geraniol is a potent inducer of apoptosis-like cell death in the cultured shoot primordia of *Matricaria chamomilla*. *Biochem Biophys Res Commun.* **259(3)**:519-22.

Jacobs, M. A., Alwood, A., Thaipisuttikul, I., Spencer, D., Haugen, E., Ernst, S., Will, O., Kaul, R., Raymond, C., Levy, R., Chun-Rong, I., Guenther, D., Bovee, D., Olsen, M. V., Manoil, C. (2003): Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 14339-14344.

Jenkins, L. S., Nunn, W. D. (1987): Genetic and molecular characterization of the genes involved in short-chain fatty acid degradation in *Escherichia coli*: the *ato* system. *J Bacteriol* **169(1)**: 42-52.

Kretzschmar, U., Rückert, A., Jeung, J.-H., Görisch, H. (2002): Malate:quinon oxidoreductase is essential for growth on ethanol or acetate in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **148**: 3839-3847.

Massey, L. K., Conrad, R. S., Sokatch, J. R. (1974): Regulation of leucine catabolism in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol.* **118(1)**:112-20.

Prakash, O., K. Kumari, and R. Lal. (2007): *Pseudomonas delhiensis* sp. nov., from a fly ash dumping site of a thermal power plant. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**:527-31.

Ramos J. L., Martinez-Bueno, M., Molina-Henares, A. J., Teran, W., Watanabe, K., Zhang, X., Gallegos, M. T., Brennan, R., Tobes, R. (2005): The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol Mol Biol Rev.* **69(2)**:326-56.

Seubert, W. (1960): Degradation of isoprenoid compounds by microorganisms: I. Isolation and characterization of an isoprenoid-degrading bacterium, *Pseudomonas citronellolis* n. sp. *J. Bacteriol.* **79**: 426-434.

Seubert, W., Remberger, U. (1963): Untersuchungen über den bakteriellen Abbau von Isoprenoiden: II. Die Rolle der Kohlensäure. *Biochemische Zeitschrift* **338**: 245-264.

Seubert, W., Fass, E., Remberger, U. (1963): Untersuchungen über den bakteriellen Abbau von Isoprenoiden: III. Reinigung und Eigenschaften der Geranylcarboxylase. *Biochemische Zeitschrift* **338**: 265-275.

Seubert, W., Fass, E. (1964a): Untersuchungen über den bakteriellen Abbau von Isoprenoiden: IV: Reinigung und Eigenschaften der β -Isohexenylglutaconyl-CoA-hydratase und β -Hydroxy- β -isohexenylglutaryl-CoA-lyase. *Biochemische Zeitschrift* **341**: 23-34.

Seubert, W., Fass, E. (1964b): Untersuchungen über den bakteriellen Abbau von Isoprenoiden: V: Der Mechanismus des Isoprenoidabbaues. *Biochemische Zeitschrift* **341**: 35-44.

Stover, K.C., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S.D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S. L., Hufnagle, W. O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G. K.-S., Wu, Z., Paulsen, I., Reizer, J., Saier, M. H., Hancock, R. E. W., Lory, S., Olson, M. V. (2000): Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: an opportunistic pathogen. *Nature* **406**: 959-964.

Windgassen, M. Urban, A., Jaeger, K.-E. (2000): Rapid gene inactivation in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett.* **193(2)**: 201-205.

Winsor, G. L., Lo, R., Sui, S. J., Ung, K.S., Huang, S., Cheng, D., Ching, W. K., Hancock, R. E., Brinkman, F. S. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* Genome Database and PseudoCAP: facilitating community-based, continually updated, genome annotation. *Nucleic Acids Res.* **33** (Database issue): D338-43.

Anhang 1



FEMS Microbiology Letters 246 (2005) 25–31

FEMS
MICROBIOLOGY
Letters

www.fems-microbiology.org

Malate:quinone oxidoreductase (MqoB) is required for growth on acetate and linear terpenes in *Pseudomonas citronellolis*

Karin Förster-Fromme, Dieter Jendrossek *

Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart, Allmandring 31, 70550 Stuttgart, Germany

Received 9 February 2005; received in revised form 14 March 2005; accepted 19 March 2005

First published online 31 March 2005

Edited by D. Jahn

Abstract

Mini-transposon-induced mutants with defects in utilization of linear terpenes such as citronellol and citronellic acid were isolated from *Pseudomonas citronellolis*. Mutants with strongly reduced growth on citronellol and citronellic acid (class I) were obtained together with mutants growing normally on citronellic acid but with impairment in growth on citronellol (class II) and auxotroph mutants (class III). The transposon carrying DNA fragments of two class I mutants were cloned and malate:quinone oxidoreductase gene (*mqoB*) was identified as the transposon insertion site in both mutants. The *mqoB* genes of *P. aeruginosa* and of *P. citronellolis* wild types were cloned. Conjugative transfer of the *mqoB* genes to the two *P. citronellolis* mutants increased the strongly reduced levels of MqoB activity in cell extracts of the mutants to the level of the wild type and restored the ability of the mutants to grow on citronellol and citronellic acid. Physiological analysis of the wild type and of mutants showed that MqoB is part of the glyoxylate cycle in *P. citronellolis* and is necessary for growth on C₂-compounds and linear terpenes such as citronellol or citronellic acid.

© 2005 Federation of European Microbiological Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Citronellol pathway; Branched-chain carbon metabolism; Malate:quinone oxidoreductase; GeranylcoenzymeA carboxylase; *Pseudomonas citronellolis*

1. Introduction

Terpenes are widespread compounds in nature and frequently appear in form of aroma compounds, e.g., such as citronellol (linear terpene) or camphor (aromatic terpene). Terpenes represent one of several subgroups of natural compounds harbouring methyl branched molecule structures derived from isoprene. Examples of other subgroups are squalene, carotenoids, steroids, polyiso-

prene (rubber). Citronellol (3,7-dimethyl-6-octen-1-ol) is a model compound of linear terpenes naturally occurring in citrus plants where it is responsible for the characteristic flavour of its fruits. Citronellol is also of industrial interest due to its commercial use in food (flavour) and perfume industry (odour); it is one of very few natural occurring repellents of insects (mosquitoes) and is commercially available as a component of outdoor candles with anti-insect capacity.

Utilization of linear terpenes by microorganisms was first studied in the early 1960s of the last century by Seubert and co-worker [1]. Seubert isolated *P. citronellolis* by its ability to utilize citronellol and related compounds as the sole source of carbon and energy [2]. Linear terpenes such as citronellol are difficult to metabolize

* Corresponding author. Tel.: +49 711 685 5483; fax: +49 711 685 5725.

E-mail address: dieter.jendrossek@imb.uni-stuttgart.de (D. Jendrossek).

because of the presence of β -methyl groups that inhibit β -oxidation. Key enzyme of the citronellol/geraniol degradation pathway is geranyl-CoA-carboxylase. It converts the β -methyl group of the branched carbon chain of geranyl-CoA to an acetate function. After hydratization of the carboxylated intermediate isohexenylglutacoyl-CoA by isohexenylglutacoyl-CoA hydratase the acetate side group is cleaved off by 3-hydroxy-3-isohexenylglutaryl-CoA lyase [3]. The major cleavage product of the lyase reaction (7-methyl-3-oxo-6-octenoyl-CoA) is then degraded by two rounds of subsequent β -oxidation reactions without hindrance by β -methyl groups [4,5]. The resulting metabolite (3-methylcrotonyl-CoA) is most probably degraded via the leucine degradation pathway that involves another methyl-branched specific carboxylase (methyl-crotonyl-CoA-carboxylase) that is unable to utilize geranyl-CoA as a substrate but that efficiently carboxylates methylcrotonyl-CoA. *P. aeruginosa* and *P. menodcina* are the only other validly described bacteria beside *P. citronellolis* with known capacity to utilize citronellol and other linear terpenes [6]. In this study, we initiated experiments to identify genes involved in the degradation pathway of linear terpenes.

2. Material and methods

2.1. Bacterial strains, plasmids and culture conditions

The bacterial strains and plasmids used in this study are shown in Table 1. *P. citronellolis* strains were cultivated at 30 °C in mineral media [7] with different carbon sources (0.3% sodium acetate, 0.5% glucose, 0.6% sodium succinate \times 6 H₂O, 0.5% malate, 0.1% citronellic

acid, 0.1% geranic acid) or 0.8% nutrient broth (NB). Water-insoluble carbon sources (citronellol) were added in the space between the petri dish and the agar (20 μ L per plate) and the plates were sealed with parafilm. *E. coli* strains were cultivated at 37 °C in Luria–Bertani media. Solid media additionally contained 1.5% (w/v) agar. A mutant of *P. citronellolis* resistant to 300 μ g/mL streptomycin was isolated by three rounds of repeated transfers of large single colonies to NB agar plates containing increasing amounts of streptomycin. For mating experiments liquid cultures of *P. citronellolis* Sm^r and *E. coli* S 17-1 (pUT mini Tn5 Tc) were mixed 1:1 and 500 μ L of the mixture were spotted on a NB plate. After 17 h of incubation at 30 °C, cells were resuspended with 4 mL 10 mM MgSO₄ and 100 μ L aliquots were plated on selection medium containing 15 μ g/mL tetracycline and 300 μ g/mL streptomycin. Colonies of arising transconjugants appeared within 3 days at 30 °C and were purified on selection medium and subsequently tested for their ability to utilize selected carbon sources.

2.2. Isolation of membranes

Late exponential cells were collected by centrifugation at 4 °C and washed with ice cold mineral salts medium without carbon source. The pellet was resuspended in 1 mL per g cells buffer A containing 0.1 M Tris, 10 mM MgSO₄, 10% (v/v) glycerol, 5 mM 2-mercaptoethanol, pH 7.4. The suspension was passed two times through a French press cell at 800 psi. Cell debris were removed by centrifugation 15 min at 10,000g and 4 °C. The supernatant was centrifuged at 80,000g in a Beckman rotor Ti 50 for 1 h at 4 °C. The membrane pellet was resuspended in maximal 400 μ L of buffer A.

Table 1
Strains and plasmids

Strain or plasmid	Relevant characteristics	References
<i>Escherichia coli</i> S17-1		[11]
<i>E. coli</i> JM109		[12]
<i>Pseudomonas citronellolis</i>	Wild type G ⁺ , C ⁺ , GS ⁺ , CS ⁺	[2]
<i>P. citronellolis</i> Sm ^r	Sm ^r [300 μ g/mL]	This study
<i>P. citronellolis</i> Sm ^r 19-1-1	G ⁻ , C ⁻ , GS ⁻ , CS ⁻	This study
<i>P. citronellolis</i> Sm ^r 27-1-1	G ⁻ , C ⁻ , GS ⁻ , CS ⁻	This study
<i>P. citronellolis</i> Sm ^r 19-1-1 with <i>mgoB</i> on pBBR1MCS-2	G ⁺ , C ⁺ , GS ⁺ , CS ⁺	This study
<i>P. citronellolis</i> Sm ^r 27-1-1 with <i>mgoB</i> on pBBR1MCS-2	G ⁺ , C ⁺ , GS ⁺ , CS ⁺	This study
pUT mini Tn5 Tc	Mutagenesis plasmid	[13]
pBluescript SK+	Cloning vector	Stratagene, San Diego, CA, USA
pBBR1MCS-2	Broad host range vector	[14]
pBluescriptSK+19-1-1 <i>Pst</i> I-fragment		This study
pBluescriptSK+27-1-1 <i>Pst</i> I-fragment		This study
pBBR1MCS-2::HindIII <i>mgoB</i> -PAO1- <i>Xba</i> I-fragment (pSK2713)		This study
pBluescriptSK+2.4 <i>Sac</i> II- <i>mgoB</i> -Pc-fragment (pSK2931)		This study
pBBR1MCS-2::2.4 <i>Sac</i> II- <i>mgoB</i> -Pc-fragment (pSK2935)		This study

Abbreviations: geraniol (G), citronellol (C), geranic acid (GS), citronellic acid (CS), growth within 3 days at 30 °C (°); no significant growth within 3 days at 30 °C (°-), streptomycin resistant (Sm^r).

2.3. Determination of MQO activity (EC 1.1.99.16)

MQO activities of membranes and supernatant fraction were measured by reduction of 2,6-dichlorophenol-indophenol (DCPIP) at 600 nm and at 30 °C (ϵ , $22 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ [8]). The assay mixture contained (in 1 mL of 50 mM Hepes, pH 7.5) 10 mM potassium acetate, 10 mM KCN, 30 μL of 5 mM DCPIP, 10 μL of 500 mM 2,3-dimethoxy-5-methyl-1,4-benzoquinone (Q_0) and 5–50 μL enzyme solution (modified according to [9]). The assay was started by addition of 20 μL of L-malate (50 mM). One unit corresponds to oxidation of 1 μmol malate per minute. In some reactions, it was necessary to increase the concentration of DCPIP due to high endogenous DCPIP bleaching activity of the cell extracts.

2.4. Cloning procedures

The Tn5-Tc containing DNA fragments were cloned from *Pst*I digests of chromosomal DNA isolated from the respective mutant. DNA fragments of the desired size (determined by Southern hybridization with Tn5-Tc as a DNA probe) were isolated from agarose gels, ligated to *Pst*I-linearized pBluescriptSK+ and transformed to *E. coli* JM109. Tc-resistant colonies of transformants were used for plasmid isolation and DNA sequencing with T3/T7 and mini-Tn5-Tc-specific primers. The site of mini-Tn5-Tc insertion in the *P. citronellolis* genome was determined by comparing the DNA sequence flanking Tn5-Tc with DNA sequences of mini-Tn5 and with the genome sequence of the closely related *P. aeruginosa* PAO1. DNA sequencing, restriction analysis, PCR and electrophoretical techniques were done by standard procedures [10]. Southern blot analysis was performed with PCR-amplified and DIG labelled tetracycline resistance gene using TcFw (5'-AATGCGTCATCGTCATCCTCGG) and TcRev (5'-CGATCCTTGAAGCTGTCCCTGA) as primers.

A 2.4 kbp *Sac*II genomic DNA fragment of *P. citronellolis* containing the *mgoB* gene fragment was identified by Southern blot analysis using the miniTn5-harboring *Pst*I-fragment from mutant #19-1-1 as a probe. *Sac*II fragments of 2.4 ± 0.6 kbp in size were cloned into pBSSK+ and transformed into *E. coli* JM 109. The clones were analyzed by colony hybridization using a 490 bp DNA fragment as a probe generated by PCR from genomic DNA using PcMqo-Fw (5'-CCGTCGGCCTGTACACACC) and PcMqo-Rev (5'-CGTTGATCTGCACCGCTTCTTG) as primers which were derived from sequencing of the miniTn5-insertion sites. The *mgoB* containing *Sac*II-fragment was then cloned in pBBR1MCS-2. The *mgoB* gene of *P. aeruginosa* PAO1 was amplified using PaMqo-Fw (5'-CCCAAGCTTGGGGCCGCATGACCCCGCACGA) and PaMqo-Rev (5'-GCTCTAGAGCCGGCGC-

CTGACTCCACAAATGAAC) as primers inserting a restriction site of *Hind*III and *Xba*I for later cloning. The PCR product was digested with *Hind*III and *Xba*I and was cloned into pBBR1MCS-2.

3. Results

3.1. Isolation of a spontaneous streptomycin resistant mutant of *P. citronellolis*

A mutant of *P. citronellolis* wild type with ability to grow in the presence of at least 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin was isolated (*P. citronellolis* Sm^r) as described in materials and methods. Repeated passages on NB medium without streptomycin did not lead to loss of the resistance and indicated that the mutation to the streptomycin resistant phenotype was stable. *P. citronellolis* Sm^r could not be distinguished from the wild type with respect to growth on NB or mineral salts medium supplemented with citronellol, citronellic acid, succinate, acetate or glucose. However, growth in the presence of 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin was slightly slower compared to the wild type without streptomycin.

3.2. Isolation of Tn5-Tc-induced mutants of *P. citronellolis* Sm^r impaired in citronellol utilization

Tn5-Tc induced mutants of *P. citronellolis* Sm^r were generated by conjugation with *E. coli* S17-1 (pUT miniTn5-Tc) as described in materials and methods and selected on NB-Sm-Tc agar. About 6000 of the obtained mutants were tested for utilization of citronellol, citronellic acid, succinate and glucose. In total, 27 mutants were identified which were impaired in growth on citronellol and/or citronellic acid. Three classes of mutants were obtained: 19 mutants (0.32%, class I) were strongly impaired in growth on citronellol and on citronellic acid while eight other mutants (0.13%, class II) grew normally on citronellic acid but did not grow on citronellol anymore. Additional mutants that could not grow on neither citronellol and citronellic acid nor on succinate or glucose were also obtained (0.12%, class III). Class III mutants apparently represent auxotrophs and were not further analyzed. Mutants with growth inhibition on citronellic acid but with normal growth on citronellol were not isolated. Although class I mutants were strongly reduced in growth on citronellol and citronellic acid a very faint growth was observed for some mutants after prolonged time of incubation on solid media (about one week) with citronellol or citronellic acid as a carbon source.

Two class I mutants, #19-1-1 (no residual growth on citronellol) and #27-1-1 (residual growth on citronellol after 1 week), were selected for further characterization.

Both mutants grew almost normally on NB medium and on glucose-containing mineral salts media but showed strongly reduced growth on linear terpenes such as citronellol, citronellic acid, geraniol and geranic acid. When growth of both mutants on C_4 - and C_2 -compounds was tested on solid media hardly any growth occurred on acetate and growth on succinate was reduced. When growth of the mutants was analyzed in liquid cultures on mineral salt medium with succinate, malate or acetate as sole sources of carbon and energy a significant increase

of the doubling times compared to the wild type were found for succinate (1.9, 4.3 and 4.3 h for wild type, mutant #19-1-1 and #27-1-1, respectively), and for malate (1.4, 6.5 and 5.8 h; Fig. 1). A very long lag-phase of about 50 h and doubling times of ≈ 23 h was found for mutant #27-1-1 on acetate in comparison to the wild type (t_d , 3.5 h). Mutant #19-1-1 did not grow above 100 Klett units within 120 h. These results suggested that the gene(s) affected by the transposon is (are) not directly involved in the degradation pathway of citronel-

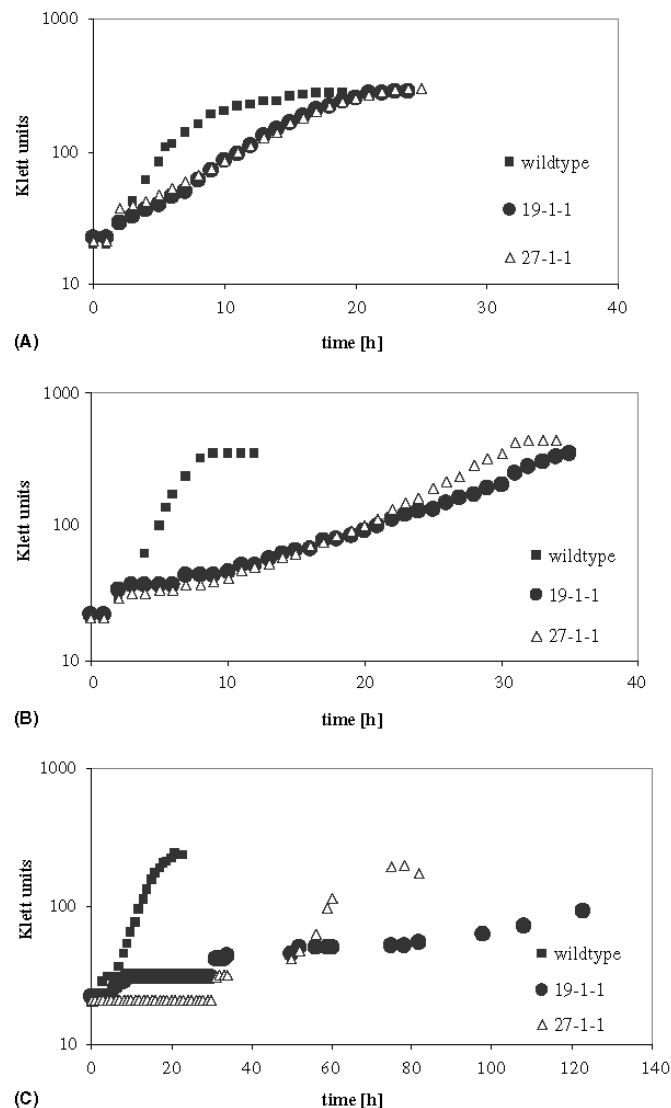


Fig. 1. Growth of *P. citronellois* Sm⁷, mutant #19-1-1 and mutant #27-1-1 on succinate (A), malate (B) and acetate (C). Cultures were inoculated with glucose-grown cells and optical density was measured using a Klett photometer.

lol but apparently are necessary for anaplerotic reactions during growth on acetate and that linear monoterpenes such as citronellol and citronellic acid are metabolized via C₂ compounds, e.g., acetyl-CoA as suggested by Seubert and coworkers.

3.3. Identification of the miniTn5 insertion sites in mutant #19-1-1 and #27-1-1

A 3.0 kbp *Pst*I fragment (mutant #19-1-1) and a 2.9 kbp *Pst*I fragment (#27-1-1) were identified as the sites of miniTn5 insertion by Southern hybridization of chromosomal DNA of the two mutants with a mini-Tn5-specific DNA probe (data not shown). The two respective DNA fragments were cloned in pBlue-script SK+ and transformed to *E. coli* JM109. The positions of mini-Tn5 insertion sites were identified by DNA sequencing of the respective recombinant plasmids. The translated DNA region around the miniTn5-insertion site in mutant #19-1-1 was highly similar to malate:quinone oxidoreductase B gene (*mgoB*) of *P. aeruginosa* and of other bacteria. In mutant #27-1-1, the transposon insertion site was 25 bp upstream of the beginning

of the same open reading as in the other mutant (#19-1-1). Due to a *Pst*I site 459 bp downstream of the start codon of the putative *mgoB* gene two different (adjacent) *Pst*I fragments had been identified by Southern hybridization with the mini-Tn5-specific DNA probe.

3.4. Cloning of the *mgoB* genes of *P. aeruginosa* and of *P. citronellolis*

To verify that inactivation of the putative *mgoB* gene by mini-Tn5 was responsible for the observed phenotype the *mgoB* genes of *P. aeruginosa* PAO1 and of *P. citronellolis* were cloned and used for complementation studies. The *mgoB* gene of *P. aeruginosa* was cloned by PCR using *mgoB*-specific primers derived from the genome sequence of *P. aeruginosa* PAO1. The *mgoB* gene of *P. citronellolis* was cloned and identified by colony hybridization of a library of *P. citronellolis* genomic DNA using a PCR product as DNA probe that had been obtained with oligonucleotides derived from sequencing of the mini-Tn5 insertion site of both mutants. A 2.1 kbp PCR fragment (*P. aeruginosa*) and a 2.4 kbp *Sac*II fragment (*P. citronellolis*) that harboured the two respective

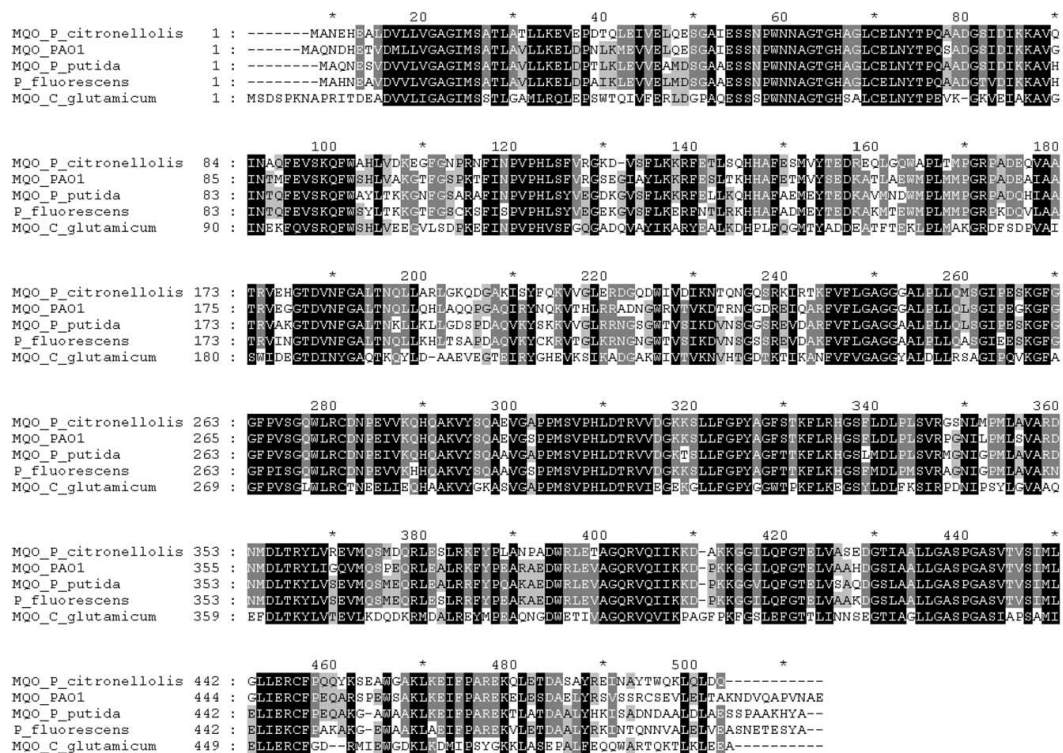


Fig. 2. Multiple sequence alignment of the *mgoB* encoded protein of *P. citronellolis* with related proteins. ClustalX program was used for alignment. Identical amino acids are shaded in black, similar are shaded in grey. *P. citronellolis* *mgoB*, *P. aeruginosa* PAO1 *mgoB*, *P. putida* KT2440 malate:quinone oxidoreductase, *P. fluorescens* Pfo-1 predicted dehydrogenase and *Corynebacterium glutamicum* malate:quinone oxidoreductase.

mgoB genes were obtained. The DNA sequence of the *P. citronellolis* 2.4 kbp *SacII* fragment was determined. The DNA sequence contained one large open reading frame (ORF, 1485 bp, Accession No. AY909610) that coded for a 54.5 kDa peptide. A 100% sequence identity of a 630 bp and a 577 bp long region to the sequences of the miniTn5-Tc insertion site in mutants #19-1-1 and #27-1-1 confirmed that the cloned gene was identical to the gene marked by the insertion of miniTn5 in both mutants. The deduced amino acid sequence of the identified ORF showed high similarity to *mgoB* of *P. aeruginosa* (74% identity, Accession No. NP_253330), *Pseudomonas putida* KT2440 (72%, NP_742912), *Pseudomonas fluorescens* Pfo-1 (70%, ZP_00263866), *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (47%, NP_601207) and to *mgoB* genes of several other bacteria (Fig. 2).

3.5. Complementation of mutants #19-1-1 and #27-1-1 by *mgoB*

The *mgoB* genes of *P. aeruginosa* and of *P. citronellolis* were cloned each into broad host range vector pBBR1MCS-2 and the resulting hybrid plasmids pSK2713 (*P. aeruginosa mgoB*) and pSK2935 (*P. citronellolis mgoB*) were transferred from *E. coli* S17-1 to *P. citronellolis* mutant #19-1-1 and mutant #27-1-1 via conjugation. Transconjugants of mutant #19-1-1 and #27-1-1 harbouring *mgoB* from *P. aeruginosa* or from *P. citronellolis* were tested for growth on solid mineral salts medium with citronellol, citronellic acid, succinate, malate and acetate. All four transconjugants showed good growth on the tested carbon sources and could not be distinguished from the corresponding wild types. When the transconjugants were grown in liquid culture on acetate, succinate or malate wild type growth rates were restored (data not shown). No significant difference between complementation of the mutants by *mgoB* of *P. citronellolis* or by *mgoB* of *P. aeruginosa* was detected.

3.6. Determination of malate:quinone oxidoreductase and of malate dehydrogenase activities

Malate:quinone oxidoreductase activities of *P. citronellolis* Sm^r, of mini-Tn5 mutants #19-1-1 and #27-1-1 and of the respective transconjugants harbouring wild type *mgoB* on pBBR1MCS-2 were determined for soluble cell extracts and of the membrane fraction. Since the mini-Tn5 mutants could not (hardly) grow on citronellol or on acetate cells were grown with glucose or malate as carbon sources for determination of enzyme activities. As shown in Table 2 membrane fractions generally yielded higher specific activities of malate:quinone oxidoreductase compared to soluble cell extracts; activities in glucose-grown cells mostly were lower compared to malate-grown cells and amounted about 40–80% of the activities measured for malate-grown cells. Mqo

Table 2

Malate:quinone oxidoreductase specific activities of soluble extracts and of membrane preparations from *P. citronellolis* Sm^r and of mutants

Strain and carbon source	Mqo activity (mU/mg)	
	Membranes	Soluble fraction
Wild type		
Citronellic acid	720	22
Isovaleric acid	580	120
Malate	120	30
Acetate	55	12
Glucose	20	5
Mutant #19-1-1		
Malate	≤3	≤3
Glucose	≤3	≤3
Mutant #27-1-1		
Malate	30	≤3
Glucose	≤3	
Mutant #19-1-1 + <i>mgoB</i> on pBBR1 MCS-2		
Malate	190	13
Glucose	72	22
Mutant #27-1-1 + <i>mgoB</i> on pBBR1 MCS-2		
Malate	240	35
Glucose	190	19
<i>E. coli</i> JM 109 pBluescriptSK+		
LB	≤3	≤3
<i>E. coli</i> JM 109 pBluescriptSK+ <i>mgoB</i> (IPTG induced)		
LB	9	5

activities of the mutants #19-1-1 and of #27-1-1 were drastically reduced compared to the wild type and amounted less than 5% of the respective wild type activities in most experiments. In the membrane fraction of malate-grown #27-1-1 cells, Mqo activity was reduced only to 25%. In transconjugants that harboured an intact copy of *mgoB* malate:quinone oxidoreductase activities were restored to the level of the wild type or were even higher and indicated that *mgoB* was actively transcribed and translated in the transconjugants. When the wild type was grown on citronellic acid and on isovaleric acid very high specific activities were determined (730 and 580 mU/mg, respectively) in the membrane fraction. NAD-dependent malate dehydrogenase (MDH) activities generally were very low in wild type and in mutants (<30 mU/mg).

3.7. Utilization of citronellol is impaired by mutation of *mgoB* in *P. aeruginosa*

The effect of a mutation in *mgoB* in *P. aeruginosa* has been analyzed by Kretzschmar et al. [15]. They found that *mgoB* is necessary for growth on ethanol and acetate. Effect of *mgoB* mutation in *P. aeruginosa* on utilization of linear terpenes was not investigated. When we tested *P. aeruginosa mgoB* mutants MS7 and UK2 for utilization of citronellol and citronellic acid both mutants were unable to utilize these linear terpenes.

The wild type of *P. aeruginosa* (strain PAO1) grew well on citronellol and citronellic acid. Apparently, MqoB activity is necessary during growth on linear monoterpenes in *P. aeruginosa* as well as in *P. citronellolis*.

4. Discussion

In this study, mini-Tn5-mutagenesis of *P. citronellolis* was performed to identify genes responsible for utilization of citronellol, geraniol and other linear terpenes. Malate:quinone oxidoreductase gene (*mgoB*) was identified as the target of mini-Tn5 in two independently isolated mutants with strong effects in growth on citronellol, citronellic acid, geraniol and geranic acid. Physiological analysis of both mutants showed additional severe growth effects during utilization of acetate and minor effects during growth on metabolites of the citric acid cycle such as succinate and malate. These data suggest that *mgoB* is indirectly responsible for utilization of linear terpenes. Since linear monoterpenes (citronellol) are degraded via acetate and acetyl coenzyme A [1–5] and since utilization of acetate requires anaplerotic reactions MqoB apparently is essential for operating a functional glyoxylate cycle. This is supported by the finding of extreme low malate dehydrogenase specific activities (<30 mU/mg). Interestingly, specific MqoB activity was significantly higher in membranes of citronellic acid grown cells (720 mU/mg) compared to acetate-grown cells (55 mU/mg) suggesting the presence of a specific upregulation of *mgoB* expression by citronellic acid or related metabolites. Comparable high MqoB activities have been published for *P. aeruginosa* PAO1 after growth on acetate (121 mU/mg), malate (88 mU/mg) or ethanol (84 mU/mg) [15]. The authors concluded that MqoB is required during growth on C₂-compounds and that malic enzyme and pyruvate carboxylase can only partially compensate for the loss of MqoB activity. Our results are in agreement with these findings.

Preliminary inspection of the other class I (citronellol and citronellic acid negative) and class II mutants (only citronellol negative) obtained in this study indicated that several other gene loci were affected in these mutants (unpublished results). We speculate that in some of these mutants the genes responsible for the oxidation of citronellol to citronellic acid and for the conversion of citronellic acid to acetyl coenzyme A could be inactivated by the transposon. Recently, Diaz-Pérez et al. [16] proposed that the genes PA2011-PA2015 of *P. aeruginosa* genome represent an operon harbouring the genes responsible for citronellol utilization in *P. aeruginosa*. It will be the aim of future studies to investigate the homologies and differences in the genomic organization of genes in *P. aeruginosa* and *P. citronellolis* specifically involved in utilization of linear terpenes.

Acknowledgments

We thank U. Kretzschmar and H. Görisch for providing *P. aeruginosa* mutants. Parts of this work were supported by the Fonds der chemischen Industrie.

References

- [1] Seubert, W. and Fass, E. (1964) Untersuchungen über den bakteriellen Abbau von Isoprenoiden: V. Der Mechanismus des Isoprenoidabbaues. *Biochem. Z.* 341, 35–44.
- [2] Seubert, W. (1960) Degradation of isoprenoid compounds by microorganisms: I. Isolation and characterisation of an isoprenoid-degrading bacterium, *Pseudomonas citronellolis* n.sp. *J. Bacteriol.* 79, 426–434.
- [3] Seubert, W. and Fass, E. (1964) Untersuchungen über den bakteriellen Abbau von Isoprenoiden: IV. Reinigung und Eigenschaften der β -Isohexenylglutaconyl-CoA-hydratase und β -Hydroxy- β -isohexenylglutaryl-CoA-lyase. *Biochem. Z.* 341, 23–34.
- [4] Seubert, W. and Remberger, U. (1963) Untersuchungen über den bakteriellen Abbau von Isoprenoiden: II. Die Rolle der Kohlensäure. *Biochem. Z.* 338, 245–264.
- [5] Seubert, W., Fass, E. and Remberger, U. (1963) Untersuchungen über den bakteriellen Abbau von Isoprenoiden: III. Reinigung und Eigenschaften der Geranylcarboxylase. *Biochem. Z.* 338, 265–275.
- [6] Cantwell, S.G., Lau, E.P., Watt, D.S. and Fall, R.R. (1978) Biodegradation of acyclic isoprenoids by *Pseudomonas* species. *J. Bacteriol.* 135, 324–333.
- [7] Schlegel, H.G., Kaltwasser, H. and Gottschalk, G. (1961) A submersion method for culture of hydrogen-oxidizing bacteria: growth physiological studies. *Arch. Mikrobiol.* 38, 209–222.
- [8] Armstrong, J.M. (1964) The molar extinction coefficient of 2,6-dichlorophenol indophenol. *Biochim. Biophys. Acta* 86, 194–197.
- [9] Molenaar, D., van der Rest, M.E. and Petrovic, S. (1998) Biochemical and genetic characterization of the membrane-associated malate dehydrogenase (acceptor) from *Corynebacterium glutamicum*. *Eur. J. Biochem.* 254, 395–403.
- [10] Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- [11] Simon, R., Priefer, U. and Pühler, A. (1983) A broad host-range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Biotechnology*, 784–791.
- [12] Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103–119.
- [13] de Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U. and Timmis, K.N. (1990) Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.* 172, 6568–6572.
- [14] Kovach, M.E., Elzer, P.H., Hill, D.S., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop, R.M. and Peterson, K.M. (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166, 175–176.
- [15] Kretzschmar, U., Ruckert, A., Jeoung, J.H. and Görisch, H. (2002) Malate:quinone oxidoreductase is essential for growth on ethanol or acetate in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 148, 3839–3847.
- [16] Diaz-Perez, A.L., Zavala-Hernandez, A.N., Cervantes, C. and Campos-García, J. (2004) The *gnyRDBHAL* cluster is involved in acyclic isoprenoid degradation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5102–5110.

Anhang 2

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, July 2006, p. 4819–4828
 0099-2240/06/\$08.00+0 doi:10.1128/AEM.00853-06
 Copyright © 2006, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 72, No. 7

Identification of Genes and Proteins Necessary for Catabolism of Acyclic Terpenes and Leucine/Isovalerate in *Pseudomonas aeruginosa*

Karin Förster-Fromme,¹§ Birgit Höschle,¹§ Christina Mack,² Michael Bott,²
 Wolfgang Armbruster,³ and Dieter Jendrossek^{1*}

*Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart, Stuttgart, Germany*¹; *Institut für Biotechnologie 1, Forschungszentrum Jülich, Jülich, Germany*²; and *Institut für Lebensmittelchemie, Universität Hohenheim, Stuttgart-Hohenheim, Germany*³

Received 11 April 2006/Accepted 16 May 2006

Geranyl-coenzyme A (CoA)-carboxylase (GCCase; AtuC/AtuF) and methylcrotonyl-CoA-carboxylase (MCCase; LiuB/LiuD) are characteristic enzymes of the catabolic pathway of acyclic terpenes (citronellol and geraniol) and of saturated methyl-branched compounds, such as leucine or isovalerate, respectively. Proteins encoded by two gene clusters (*atuABCDEFGH* and *liuABCDE*) of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 were essential for acyclic terpene utilization (Atu) and for leucine and isovalerate utilization (Liu), respectively, as revealed by phenotype analysis of 10 insertion mutants, two-dimensional gel electrophoresis, determination of GCCase and MCCase activities, and Western blot analysis of wild-type and mutant strains. Analysis of the genome sequences of other pseudomonads (*P. putida* KT2440 and *P. fluorescens* Pf-5) revealed candidate genes for Liu proteins for both species and candidate genes for Atu proteins in *P. fluorescens*. This result concurred with the finding that *P. fluorescens*, but not *P. putida*, could grow on acyclic terpenes (citronellol and citronellate), while both species were able to utilize leucine and isovalerate. A regulatory gene, *atuR*, was identified upstream of *atuABCDEFGH* and negatively regulated expression of the *atu* gene cluster.

Acyclic terpenes, such as citronellol and geraniol, are aroma compounds frequently occurring in plants. Citronellol (3,7-dimethyl-6-octen-1-ol) is used in the food and perfume industries but is also used as a natural repellent of mosquitoes (19). Geraniol is an aroma compound typical for plants of the genus *Geranium*; it is structurally related to citronellol and differs from the latter only by the presence of an additional double bond. Citronellol and geraniol are model compounds of acyclic monoterpenes and belong to the family of acyclic methyl-branched molecules derived from isoprene. Related compounds are carotenoids, steroids, and polyisoprene (rubber). Leucine and isovalerate are examples of saturated molecules with a methyl-branched carbon backbone. Recently, it was found that geraniol and similar acyclic terpenes can have significant effects on mammalian cells and can even induce apoptosis in vitro in pancreatic cancer cells (5, 7, 11, 22). Apparently, the physiological activities and cellular functions of monoterpenes are underestimated. The poor information on the biochemical routes of monoterpenes in organisms might be one reason for this lack of knowledge. Citronellol is the only acyclic monoterpene for which some information exists on its biochemistry in microorganisms (see below).

The degradation pathway of acyclic (mono)terpenes, such as citronellol or geraniol, was investigated in *Pseudomonas citronellois* by Seubert and coworkers in the 1960s (28–32) and by Fall and coworkers in the 1970s (12, 14, 15). A putative pathway leading from citronellol to acetate, acetyl coenzyme A (acetyl-CoA), and acetoacetate as end products based on the

above-mentioned biochemical investigations is shown in Fig. 1. The pathway includes three phases. (i) Citronellol and geraniol are oxidized to citronellate and geranylolate, respectively, and activated to the corresponding CoA thioesters. Citronellyl-CoA is oxidized to geranyl-CoA. Geranyl-CoA is subsequently carboxylated by geranyl-CoA carboxylase (GCCase), hydrated at the double bond by isohexenylglutaconyl-CoA-hydratase, and the product is cleaved into acetate and 7-methyl-3-oxo-6-octenoyl-CoA. As a result, the branched β -methyl group that would inhibit β -oxidation, is cleaved off as acetate. This biochemical route is named the acyclic terpene utilization (Atu) pathway (Fig. 1). (ii) 7-Methyl-3-oxo-6-octenoyl-CoA can be now oxidized by two rounds of β -oxidation. (iii) The product, 3-methylcrotonyl-CoA, concurs with the leucine/isovalerate utilization (Liu) pathway, which includes a second hydratase and carboxylase step catalyzed by methylglutaconyl-CoA-hydratase and methylcrotonyl-CoA carboxylase (MCCase) (Fig. 1). MCCase differs from GCCase in *P. citronellois* in its substrate specificity (15, 18). Studies of Fall and coworkers suggested that utilization of acyclic terpenes might be very similar in *Pseudomonas aeruginosa* and probably in *Pseudomonas mendocina* (6, 14).

Knowledge of the structural genes involved in catabolism of methyl-branched compounds was poor until recently. A cluster of six genes (*gnyRDBHAL* [open reading frames PA2011 to PA2016], renamed the *liuRABCDE* gene cluster) was reported to be necessary for degradation of linear terpenes in *P. aeruginosa* (10). However, studies in our lab suggested that the *liu* gene cluster is only indirectly involved in terpene utilization (Fig. 1) and that another gene cluster (*atu* gene cluster, *atuABCDEFGH* [Fig. 1]) is more likely to encode proteins specific for acyclic terpene utilization (20). Recent results of Aguilar et al. (1) were in agreement with this assumption. In this study we identified most of the putative gene products of

* Corresponding author. Mailing address: Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart, Allmandring 31, 70550 Stuttgart, Germany. Phone: 49-711-685-65483. Fax: 49-711-685-65725. E-mail: dieter.jendrossek@imb.uni-stuttgart.de.

§ These authors contributed equally to this work.

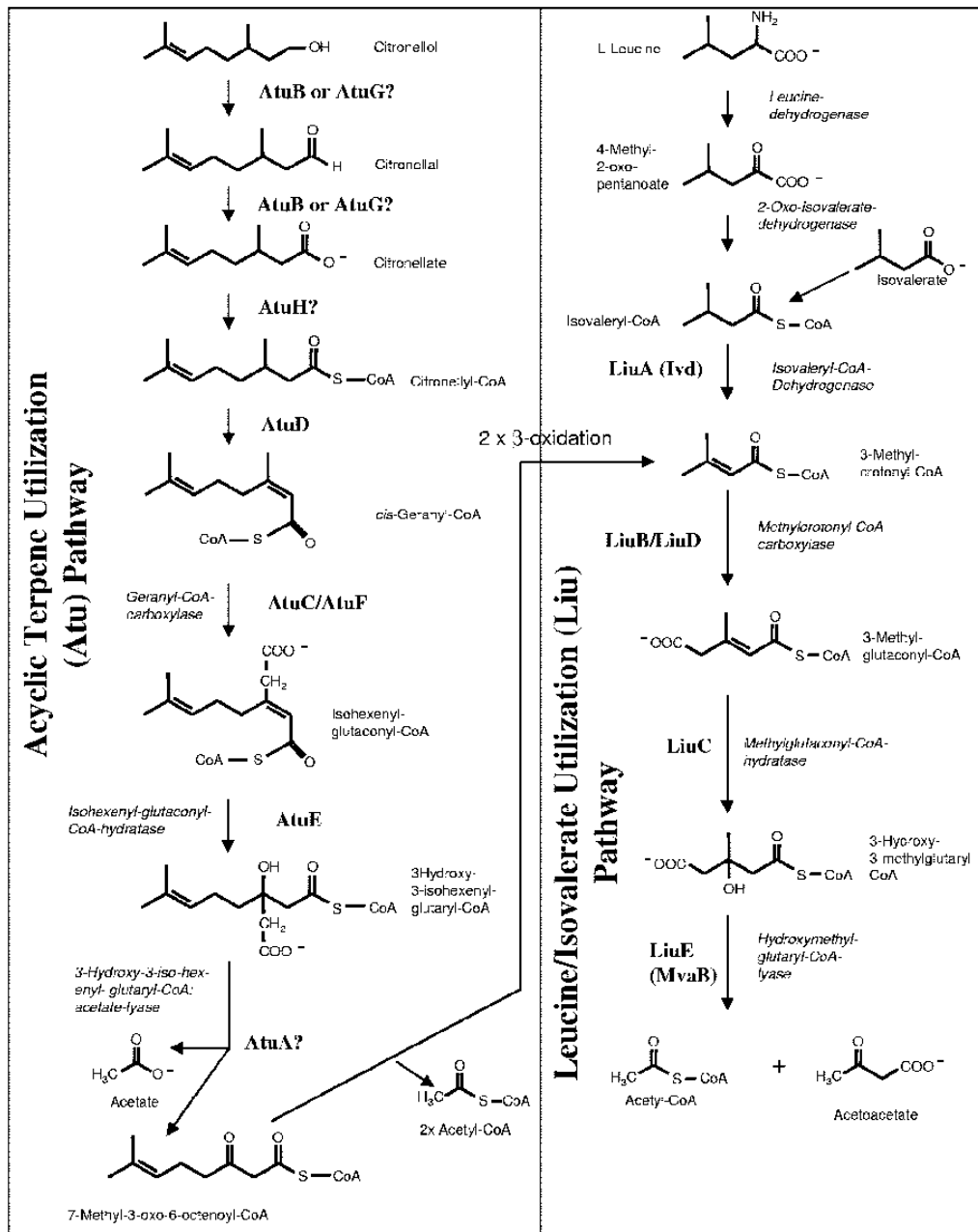


FIG. 1. Acyclic terpene utilization (Atu) and leucine/isovalerate utilization (Liu) pathways according to Seubert and Fass (30) as modified by Höschle et al. (20). Proposed functions based on phenotype analysis, enzyme activity determination, Western blot analysis, and/or amino acid alignments of identified gene products are indicated. Question marks indicate speculative assignments.

TABLE 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristic(s)	Reference or source
Strains		
<i>Escherichia coli</i> JM109	Cloning strain	36
<i>E. coli</i> S17-1	Mobilizing strain	33
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Wild type; utilizes citronellol and isovalerate	ATCC (ATCC 15692)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5	Wild type; utilizes citronellol and isovalerate	25
<i>Pseudomonas citronellolis</i>	Wild type; utilizes citronellol and isovalerate	28
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	Wild type; utilizes isovalerate	ATCC (ATCC 47054)
<i>P. aeruginosa</i> strains ^a		
PAO1 Sm ^r	Spontaneous streptomycin-resistant mutant of PAO1 (≥ 500 $\mu\text{g/ml}$); Sm ^r	21
PAO1 Sm ^r 22B/1/1 (<i>atuE</i> ::mini-Tn5)	Transposon mutant of PAO1; Tc ^r transposon inserted in <i>atuE</i>	This study
PAO1 Sm ^r <i>ins-atuR</i>	pKnockout-G: <i>atuR</i> ; Sm ^r Gm ^r	This study
PAO1 Sm ^r <i>ins-atuA</i>	pKnockout-G: <i>atuA</i> ; Sm ^r Gm ^r	This study
PAO1 Sm ^r <i>ins-atuB</i>	pKnockout-G: <i>atuB</i> ; Sm ^r Gm ^r	This study
PAO1 Sm ^r <i>ins-atuC</i>	pKnockout-G: <i>atuC</i> ; Sm ^r Gm ^r	This study
PAO1 Sm ^r <i>ins-atuD</i>	pKnockout-G: <i>atuD</i> ; Sm ^r Gm ^r	This study
PAO1 Sm ^r <i>ins-atuE</i>	pKnockout-G: <i>atuE</i> ; Sm ^r Gm ^r	This study
PAO1 Sm ^r <i>ins-atuF</i>	pKnockout-G: <i>atuF</i> ; Sm ^r Gm ^r	20
PAO1 Sm ^r <i>ins-atuG</i>	pKnockout-G: <i>atuG</i> ; Sm ^r Gm ^r	This study
PAO1 Sm ^r <i>ins-atuH</i>	pKnockout-G: <i>atuH</i> ; Sm ^r Gm ^r	This study
PAO1 Sm ^r <i>ins-liuD</i>	pKnockout-G: <i>liuD</i> ; Sm ^r Gm ^r	This study
PAO1 Sm ^r <i>ins-liuC</i>	pKnockout-G: <i>liuC</i> ; Sm ^r Gm ^r	This study
Plasmids		
pUT miniTn5-Tc	Mutagenesis plasmid; Tc ^r	9
pKnockout-G	Suicide vector for rapid gene inactivation in <i>P. aeruginosa</i>	35
pKnockout-G: <i>atuR</i>	Including an 3' and 5' truncated fragment of <i>atuR</i> ; Amp ^r Gm ^r	This study
pKnockout-G: <i>atuA</i>	Including an 3' and 5' truncated fragment of <i>atuA</i> ; Amp ^r Gm ^r	This study
pKnockout-G: <i>atuB</i>	Including an 3' and 5' truncated fragment of <i>atuB</i> ; Amp ^r Gm ^r	This study
pKnockout-G: <i>atuC</i>	Including an 3' and 5' truncated fragment of <i>atuC</i> ; Amp ^r Gm ^r	This study
pKnockout-G: <i>atuD</i>	Including an 3' and 5' truncated fragment of <i>atuD</i> ; Amp ^r Gm ^r	This study
pKnockout-G: <i>atuE</i>	Including an 3' and 5' truncated fragment of <i>atuE</i> ; Amp ^r Gm ^r	This study
pKnockout-G: <i>atuF</i>	Including an 3' and 5' truncated fragment of <i>atuF</i> ; Amp ^r Gm ^r	20
pKnockout-G: <i>atuG</i>	Including an 3' and 5' truncated fragment of <i>atuG</i> ; Amp ^r , Gm ^r	This study
pKnockout-G: <i>atuH</i>	Including an 3' and 5' truncated fragment of <i>atuH</i> ; Amp ^r Gm ^r	This study
pKnockout-G: <i>liuD</i>	Including an 3' and 5' truncated fragment of <i>liuD</i> ; Amp ^r Gm ^r	This study
pKnockout-G: <i>liuC</i>	Including an 3' and 5' truncated fragment of <i>liuC</i> ; Amp ^r Gm ^r	This study

^a Strains with insertion mutations in genes are indicated by "ins" preceding the gene.

the *atu* and *liu* gene clusters by two-dimensional (2D) gel electrophoresis. The importance of individual *atu* and *liu* genes for functionality of the two combined pathways was investigated by GCase and MCase activity determination, insertion mutagenesis, and Western blot analysis.

MATERIALS AND METHODS

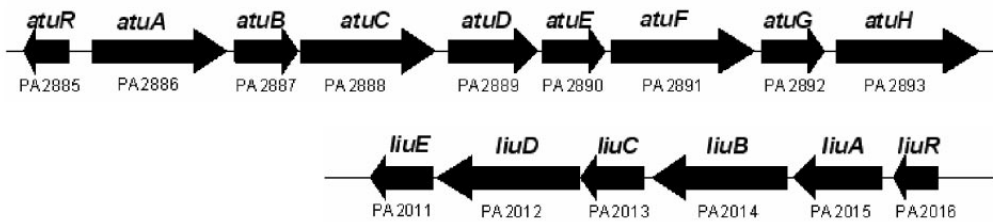
Bacterial strains, plasmids, and culture conditions. The bacterial strains and plasmids used in this study are shown in Table 1. Growth of bacteria in liquid culture was performed as described elsewhere (20). Growth on solid media with liquid carbon sources was performed in separate incubators to avoid cross contamination by vapors. Liquid cultures contained 0.5% glucose or 0.075% glucose and 0.1% of sodium citronellate or 0.1% sodium isovalerate.

Insertion mutagenesis. Transposon mutagenesis with pUTminiTn5-Tc and identification and sequencing of transposon insertion fragments were performed as described previously (21). Gene disruptions were carried out using pKnockout-G (35) as described previously (20). Correctness of the respective insertion event was verified by PCR using one gene-specific and one pKnockout-specific primer (data not shown). Polar downstream effects were avoided by selection of those mutants in which the *lac* promoter of pKnockout (constitutively expressed in *P. aeruginosa*) was oriented colinearly to the respective gene cluster, resulting in constitutive transcription of the genes. Insertion mutagenesis of open reading frame PA2885 (*atuR*) was performed as described later in the text.

Synthesis of geranyl-CoA and HPLC-(ESI)MS determination of CoA compounds. Synthesis of geranyl-CoA was done by the mixed-anhydride method described elsewhere (17) with some modifications. Geranic acid (770 μmol) was dissolved in 5.1 ml tetrahydrofuran and neutralized by adding an equimolar amount of triethylamine. Ethylchloroformate (770 μmol) was added, and the mixture was stirred for 30 min at room temperature and filtered (4 μm pore size). The filtrate containing the anhydride was added dropwise to 58 μmol coenzyme A that had been dissolved in a 3:2 mixture (pH 8.0) of 12 ml water to tetrahydrofuran (with solid NaHCO_3). After the mixture was stirred for 25 min, 4 ml of water was added and the pH was adjusted to 3.0 with 2N HCl. The solution was extracted three times with diethyl ether. The aqueous phase was lyophilized. Liquid chromatography coupled to mass spectrometry with an electrospray interface [(ESI)MS] was run on an HP1100 high-performance liquid chromatography (HPLC) system (Agilent, Waldbronn, Germany) coupled with a Micro-mass VG platform II quadrupole mass spectrometer and an electrospray interface. Chromatographic conditions were as follows: column, Hypersil gold C₁₈ (1.9 μm ; 50 \times 2.1 mm); 25°C; flow rate, 0.2 ml/min; eluent mixture A (10 mM ammonium formate [98%]-methanol [2%] [vol/vol]) and eluent mixture B (acetonitrile gradient; percent acetonitrile 3% [at 0 to 3 min] to 100% [at 20 to 24 min]). Geranyl-CoA synthesized as mentioned above was identified by detection of the expected quasimolecular ion ([M-H]⁻) *m/z* 916 and the corresponding Na adduct ([M-2H+Na]⁻) *m/z* 938 in the major HPLC peak (not shown).

2D gel electrophoresis. The cells of interest (2 to 3 g) were resuspended in 1 ml of 0.1 M HEPES buffer (pH 7.4) per g of cells before 100 μl DNase I (100 $\mu\text{g/ml}$), 50 μl RNase A (10 mg/ml), and 150 μl 10 mM MgSO_4 were added. The suspension was passed two times through a precooled French press cell at 800

***P. aeruginosa* PAO1**



Annotated functions:

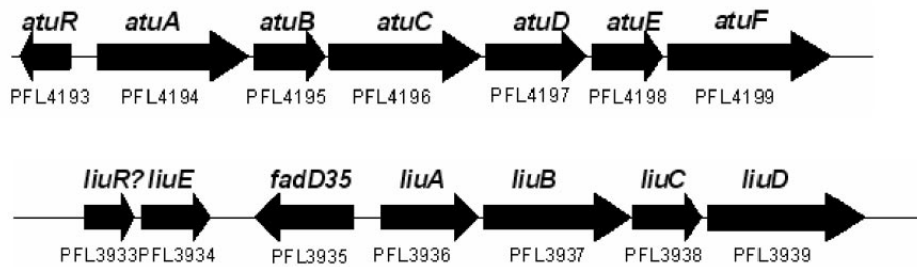
- AtuR: probable transcription regulator
- AtuA: hypothetical protein
- AtuB: probable short-chain dehydrogenase
- AtuC: probable biotin-dependent carboxylase
- AtuD: probable acyl-CoA dehydrogenase
- AtuE: probable enoyl-CoA hydratase/isomerase
- AtuF: probable biotin carboxylase
- AtuG: probable short chain dehydrogenase
- AtuH: probable very-long-chain acyl-CoA synthetase

- LiuR: probable transcription regulator
- LiuA: probable acyl-CoA dehydrogenase
- LiuB: probable acyl-CoA carboxyltransferase, β -chain
- LiuC: probable enoyl-CoA hydratase/isomerase
- LiuD: probable acyl-CoA carboxylase, α -chain
- LiuE: hydroxymethylglutaryl-CoA lyase

<i>P. aeruginosa</i> PAO1	<i>P. fluorescens</i> Pf-5	<i>P. putida</i> KT2440	<i>P. aeruginosa</i> PAO1
AtuA	AtuA 79%		
AtuB	AtuB 84%	PP1817 33%	PA1649 33%
AtuC	AtuC 82%	LiuB 44%	LiuB 44%
AtuD	AtuD 91%	LiuA 35%	LiuA 34%
AtuE	AtuE 75%	LiuC 37%	LiuC 38%
AtuF	AtuF 70%	LiuD 51%	LiuD 51%
AtuG	PFL1850 32%	PP4148 32%	PA0182 37%
AtuH	PFL4344 50%	PP0763 24%	PA4198 27%
LiuA	LiuA 87%	LiuA 87%	AtuD 34%
LiuB	LiuB 86%	LiuB 85%	AtuC 44%
LiuC	LiuC 67%	LiuC 67%	AtuE 38%
LiuD	LiuD 74%	LiuD 76%	AtuF 51%
LiuE	LiuE 78%	LiuE 78%	PA1217 21%

Similarities between Atu and Liu proteins (% amino acid identity)

***P. fluorescens* Pf-5**



***P. putida* KT2440**

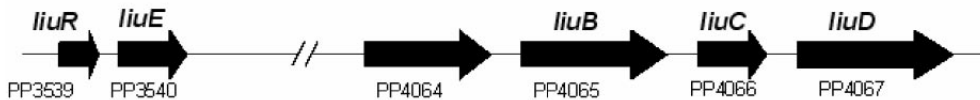


FIG. 2. Comparison of the relative positions of *atu* and *liu* genes in *P. aeruginosa* PAO1, *P. fluorescens* Pf-5, and *P. putida* KT2440. Annotated functions and amino acid similarity values of *P. aeruginosa* *atu* and *liu* gene products are also given (percent identity).

lb μ n² and centrifuged at 80,000 \times g for 1 h at 4°C. 2D electrophoresis was performed using 18-cm-long immobilized pH gradient strips (pH 3 to 10 or pH 4 to 7) that had been rehydrated under mineral oil at room temperature overnight (340 μ l rehydration solution contained 7 M urea, 2 M thiourea, 2% (wt/vol) 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate, 0.002% (wt/vol) bromophenol blue, 10 mM dithiothreitol (DTT), 0.5% Pharmalyte pH 3 to 10 or pH 5 to 8, and 500 μ g soluble protein). Isoelectric focusing was performed at 500 V for 1 min, 500 to 3,500 V for 1 h 30 min and at 3,500 V for 6 h 20 min in a Multiphor II apparatus under mineral oil at 20°C. The focused strips were equilibrated in buffer I containing 4% (wt/vol) sodium dodecyl sulfate (SDS), 50 mM Tris, 6 M urea, 30% (vol/vol) glycerol, 0.002% (wt/vol) bromophenol blue, and 2% (wt/vol) DTT for 15 min and then in buffer II containing 2.5% (wt/vol) iodoacetamide instead of DTT for another 15 min at room temperature. Each strip was run into a 10% (wt/vol) SDS-polyacrylamide gel for the molecular mass dimension using a Hoefer isodalt apparatus (Amersham Biosciences) at 100 V overnight. Protein spots were detected by overnight colloidal Coomassie blue staining in 8% (wt/vol) ammonium sulfate, 2% (vol/vol) phosphoric acid, 5% (wt/vol) Coomassie blue G250, and 20% (vol/vol) methanol. Equipment was from GE Healthcare.

Determination of GCcase and MCcase activity. Late exponential cells (carbon sources as indicated in the text) were collected by centrifugation at 4°C and washed with mineral salts medium without a carbon source. The pellet was resuspended in 1 ml of 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, per g of cells. The supernatant obtained after the cells were ruptured by French press treatment (twice) and centrifuged (80,000 \times g, 1 h) was used. GCcase and MCcase activities were measured at 340 nm (30°C) as described by Fall (13). The assay mixture contained the following (in 1 ml of 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0): 10 mM MgCl₂, 0.5 mM ATP, 10 mM KHCO₃, 0.2 mM phosphoenolpyruvate, 0.1 mg ml⁻¹ NADH, 0.5 mg ml⁻¹ bovine serum albumin, 6.3 U ml⁻¹ pyruvate kinase, 13.0 U ml⁻¹ lactate dehydrogenase, and 10 to 20 μ l of soluble crude extract. The assay was started by adding 150 μ M (final concentration) methylcrotonyl-CoA or geranyl-CoA. One unit of activity is defined as 1 μ mol of product formed per minute. Isolation of biotin-containing proteins from soluble cell extracts was done with immobilized monomeric avidin as described previously (20). Protein determination was performed by the Bradford procedure (4).

Protein identification by peptide mass fingerprinting. For peptide mass fingerprinting, the protein spots of interest were excised from Coomassie blue-stained gels and subjected to in-gel digestion with trypsin as described previously (26). Peptides were extracted by sequential addition of 12 μ l water and 10 μ l 0.1% (vol/vol) trifluoroacetic acid in 30% (vol/vol) acetonitrile. The resulting peptide solution (0.5 μ l) was mixed on a stainless steel sample plate with 0.5 μ l of a saturated cyano-4-hydroxy-*trans*-cinnamic acid solution in 50% (vol/vol) acetonitrile and 0.1% (vol/vol) trifluoroacetic acid. Samples were analyzed manually with an Applied Biosystems (Weiterstadt, Germany) Voyager STR matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometer in the positive reflector mode at 20 kV and 63% grid voltage, and the delay time was set at 125 ns. External calibration was performed using calibration mixtures 1 and 2 of the Sequazyme peptide mass standard kit. Data analysis was performed using Voyager Control Panel 5.0 and Voyager Data Explorer 3.5 software. The generated mass lists were used to search a local digestion product database of 5,567 *P. aeruginosa* PAO1 proteins (34) using ProteinProspector MS-Fit (8) available at <http://prospector.ucsf.edu>.

RESULTS

Screening of >8,000 mini-Tn5-induced mutants for defects in acyclic terpene utilization revealed one mutant (22B-1-1) that was unable to utilize any of the four monoterpenes tested as the sole source of carbon and energy (citronellol, citronellate, geraniol, and geranylate). Growth of this mutant on mineral salts medium (containing leucine [0.2%], isovalerate [0.2%], acetate [0.3%], succinate [0.6%], or glucose [0.5%]) or NB medium was not impaired and indicated that the mutation was specific for metabolism of acyclic terpenes. The site of transposon insertion was identified at position 3243626 of the *P. aeruginosa* genome. This position is located in the coding region of open reading frame PA2890 (*atuE*) that is part of a gene cluster containing eight genes with open reading frames PA2886 to PA2893 (*atuABCDEFGH*) and that had been an-

notated as a putative enoyl-CoA hydratase/isomerase gene (Fig. 1 and 2). Comparison of the putative gene products of the *atuABCDEFGH* gene cluster with the database revealed high amino acid similarities (70 to 96%) to gene products of similar gene clusters of genome-sequenced *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 and to gene products of a recently cloned *atu* gene cluster of *P. citronellois* (16), but not to gene products of other sequenced pseudomonads (*Pseudomonas putida*) (Fig. 2). The similarity values of the *Atu* proteins to respective *Liu* proteins of the *liuABCDE* gene cluster of *P. aeruginosa* and related pseudomonads were between 34 and 51%. Finding amino acid similarities between *Atu* and *Liu* proteins is not surprising, because both pathways have several similar reactions (Fig. 1). As shown in Table 2, all three bacterial species with an *atu* gene cluster (*P. aeruginosa*, *P. citronellois*, and *P. fluorescens* Pf-5) were able to utilize acyclic terpenes, but species without an *atu* gene cluster (*P. putida*) were not. All mentioned species have a *liu* gene cluster and are able to utilize leucine and isovalerate as the sole source of carbon and energy. This finding is in agreement with the assumption that the *atuABCDEF* gene cluster encodes proteins of the acyclic terpene-utilizing pathway (Fig. 1) and that the *liu* gene cluster is necessary for leucine/isovalerate utilization (Fig. 1).

2D gel electrophoresis. To investigate which proteins of the two pathways (*Atu* versus *Liu*) were specifically induced during growth on acyclic terpenes and on saturated methyl-branched compounds, 2D gel electrophoresis was performed. We compared cell extracts of succinate-grown cells (control) with citronellol-, citronellate-, and isovalerate-grown cells. Each sample was separated repeatedly in a wide (pH 3 to 10) and narrow (pH 4 to 7) pH range during isoelectric focusing to obtain maximal resolution. Several spots that were present only in citronellate-, citronellol-, and/or isovalerate-grown cells but that were absent or were present in reduced intensity in succinate-grown cells were identified (examples shown in Fig. 3; for details, see Table 3). The respective spots were isolated after Coomassie blue staining and subjected to trypsin peptide analysis, and the resulting masses were compared with theoretical values deduced from the *P. aeruginosa* genome database. Table 3 shows the results: five of the eight potential *Atu* proteins (*AtuA*, *AtuB*, *AtuE*, *AtuF*, and *AtuG*) were identified only in citronellol- and citronellate-grown cells and were not present in isovalerate- or succinate-grown cells. Interestingly, one other spot corresponding to the gene product of open reading frame PA1342, which is part of a four-gene cluster (PA1339 to PA1342) with putative function as an ABC transporter, was also specifically expressed in cells grown on acyclic terpenes. This protein might be involved in uptake of acyclic terpenes. Three of the six predicted *liu* gene products (*LiuA*, *LiuB*, and *LiuC*) and several other proteins were identified in terpene-grown and isovalerate-grown cells (Table 3) but were absent or present at a significantly lower spot intensity in succinate-grown cells. The latter include proteins with putative functions related to the tricarboxylic acid cycle (isocitrate lyase and glutamate synthase) and to C₂ carbon metabolism (acetyl-CoA-acetyltransferase and acetyl-CoA-acetoacetate transferase). This finding is not surprising, as both isovalerate and acyclic terpenes are metabolized to acetate, acetyl-CoA, and acetoacetate and enter the tricarboxylic acid cycle and the glyoxylate shunt.

TABLE 2. Phenotypes of selected wild-type and mutant strains

Strain ^b	Growth on ^a :						
	CL	GL	CA	GA	Leu	IsoV	Succ
PAO1	++	+	++	++	+	++	++
PAO1 22B/1/1 (<i>atuE</i> ::mini-Tn5)	-	-	-	-	+	++	++
PAO1 <i>ins-atuA</i>	-*	-	-*	-	+	++	++
PAO1 <i>ins-atuB</i>	-*	-	-*	-	+	++	++
PAO1 <i>ins-atuC</i>	-	-	-	-	+	++	++
PAO1 <i>ins-atuD</i>	-*	-*	-*	-	+	++	++
PAO1 <i>ins-atuE</i>	+	+	+	+	+	++	++
PAO1 <i>ins-atuF</i>	-*	-	-*	-	+	++	++
PAO1 <i>ins-atuG</i>	++	+	++	++	+	++	++
PAO1 <i>ins-atuH</i>	++	+	++	++	+	++	++
PAO1 <i>ins-liuC</i>	-*	-	-	-	-	-*	++
PAO1 <i>ins-liuD</i>	-*	-	-*	-	-	-*	++
PAO1 <i>ins-atuR</i>	++	+	++	++	+	++	++
<i>P. citronellolis</i>	++	+	++	++	++	++	++
<i>P. fluorescens</i> Pf-5	++	-	++	-	++	+	++
<i>P. putida</i> KT2440	-	-	-	-	++	++	++

^a Bacteria were incubated on solid mineral salts medium with the following carbon sources at 30°C for 4 days: citronellol (CL), geraniol (GL), citronellate (CA), geranylate (GA), leucine (Leu), isovalerate (IsoV), and succinate (Succ). Good growth (++), growth (+), poor growth (±), and no growth (-) is indicated. An asterisk indicates that single colonies came up spontaneously during incubation and probably represent suppression mutants.

^b Strains with insertion mutations in genes are indicated by "ins" preceding the gene.

Insertion mutations in *atu* and *liu* gene cluster. To investigate the importance of the individual genes of the *atu* and *liu* gene clusters, all eight *atu* genes and two of the *liu* genes were mutated by insertion mutagenesis (Tables 1 and 2). pKnockout-G was used as an insertion vector throughout. This vector has a constitutive (*in P. aeruginosa*) *lac* promoter, and care was taken that this *lac* promoter was oriented colinearly to the direction of transcription of the target gene. By doing this, we avoided

downstream effects of the insertion. Other methods of gene inactivation, such as site-directed deletion of a gene, led to a downstream effect, as revealed by the inability of an *atuA* deletion mutant to express biotin-containing carboxylase subunit (AtuF) (data not shown). In contrast to this, insertion of pKnockout in *atuA* resulted in constitutive expression of AtuF and confirmed the functionality of the pKnockout-encoded *lac* promoter. Table 2 shows the phenotypes of the respective insertion mutants in comparison to the wild type. Insertion in *atuA*, *atuB*, *atuC*, *atuD*, or *atuF* resulted in inability of the strains to utilize acyclic terpenes, while growth on leucine, isovalerate, and unrelated carbon sources was not impaired. Insertions in *atuG* or *atuH* had no detectable effects. Mutants with insertion in *liuC* or *liuD* could not utilize either acyclic terpenes or leucine or isovalerate. An interesting observation was made for two different *atuE* insertion mutants: while the mini-Tn5-induced *atuE* mutant was completely unable to utilize acyclic terpenes, the pKnockout-derived *atuE* insertion mutant showed reduced but nevertheless significant growth on acyclic terpenes (Table 2). Apparently, the insertions had polar downstream effects, but the constitutively expressed *lac* promoter compensated for these effects in the pKnockout-derived mutant. The result indicated that AtuE (putative isohexenylglutaconyl-CoA hydratase [see below]) is important but is obviously not essential for growth on acyclic terpenes and can be partially replaced by other (hydratase) isoenzymes. This conclusion is different from results recently reported on the effect of *atuE* insertion (1).

MCCase and GCCase activities. Comparison of the amino acid sequences of AtuC/AtuF and LiuB/LiuD showed high similarities to the two subunits of biotin-containing carboxylases. Since the Atu and Liu pathway each contain one carboxylase step (GCCase and MCCase) and since the AtuC and AtuF insertion mutants were unable to grow on acyclic terpenes but still

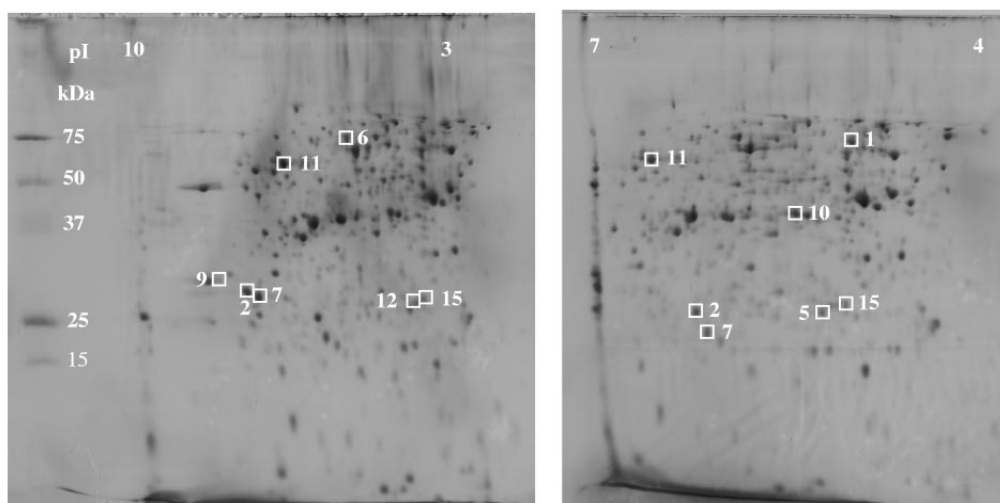


FIG. 3. Two-dimensional gel electrophoresis of soluble *P. aeruginosa* proteins after growth on citronellol. The positions of marker proteins and the direction of isoelectric focusing are indicated. Two different pH gradients (pH 3 to 10 NL [left] and pH 4 to 7 [right]) were used. Proteins spots not visible in succinate-grown cells are indicated. The numbering of the spots is the same as in Table 3.

TABLE 3. Proteins, genes, and assigned functions in catabolism of acyclic terpenes and isovalerate^a

Spot no.	PA no.	Proposed name	No. of peptides that matched	% Coverage	Expression of proteins in cells grown on ^b :				Proposed function
					Succ	IsoV	CL	CA	
1	2886	AtuA	12	32	-	-	+	+	3-Hydroxy-3-isohexenylglutaryl-CoA:acetate-lyase?
2	2887	AtuB	6	32	-	-	+	+	Citronellol/citronellal dehydrogenase
3	2888	AtuC	WB		-	-	+	+	GCCase, β-subunit
4	2889	AtuD	ND		-	-	+	+	Citronellyl-CoA dehydrogenase
5	2890	AtuE	8	34	-	-	+	+	Isohexenylglutaconyl-CoA hydratase
6	2891	AtuF	20/WB	44	-	-	+	+	GCCase, α-subunit (biotin containing)
7	2892	AtuG	20	68	-	-	+	+	Citronellol/citronellal dehydrogenase
8	2893	AtuH	ND		-	-	+	+	Citronellyl-CoA synthetase
9	1342		15	42	-	-	+	+	Periplasmic binding protein (ABC transporter)
10	2015	LiuA	15	37	-	+	+	+	Isovaleryl-CoA Dehydrogenase
11	2014	LiuB	19/WB	45	-	+	+	+	MCCase, β-subunit
12	2013	LiuC	9	28	-	+	+	+	Methylglutaconyl-CoA hydratase
13	2012	LiuD	WB		-	+	+	+	MCCase, α-subunit (biotin containing)
14	2011	LiuE	ND		-	+	+	+	3-Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase
15	1999	AtoD	6	41	-	+	+	+	Acetyl-CoA:acetoacetate-CoA transferase
16	2001	AtoB	15	75	\pm	+	+	+	Acetyl-CoA acetyltransferase
17	2634	Icl	16	33	\pm	+	+	+	Isocitrate lyase
18	5035	GHD	16	40	\pm	\pm	\pm	\pm	Glutamate synthase

^a Hypothetical proteins are given in normal roman type. Proteins with experimentally verified function are given in bold type. Expression of proteins was shown in cells grown on succinate (Succ), isovalerate (IsoV), citronellol (CL), and citronellate (CA) by 2D gel electrophoresis or by Western blotting (WB) and trypsin peptide analysis or not determined (ND).

^b Symbols: -, no expression; +, significant expression; \pm , poor or uncertain expression.

utilized isovalerate as a carbon source, we assumed that AtuC/AtuF and LiuB/LiuD represented GCCase and MCCase subunits, respectively. To find direct experimental evidence for this assumption, we assayed GCCase and MCCase activity. *P. aeruginosa* PAO1 wild type and two insertion mutants (*atuF* and *liuD*) were grown on glucose, citronellate, and isovalerate. Isovalerate- and citronellate-grown cultures (each 0.1%) additionally contained 0.075% glucose in order to enable growth of the mutants. None of the strains contained significant MCCase or GCCase activity after growth on glucose (<3 mU/mg). Soluble cell extracts of citronellate-grown wild-type cells contained 33 mU/mg and 15 mU/mg MCCase and GCCase activity, respectively, indicating that the AtuC and Liu pathways were both operating (Table 4). MCCase activity (45 mU/mg) but no detectable GCCase activity was determined for isovalerate-grown wild-type cells, confirming that the Liu pathway is operating in

TABLE 4. Specific GCCase and MCCase activities of soluble cell extracts^a

<i>P. aeruginosa</i> strain ^b and carbon source	Sp act (mU/mg)	
	GCCase	MCCase
WT, glucose	≤ 3	≤ 3
WT, citronellate	15	33
WT, isovalerate	≤ 3	45
ins- <i>liuD</i> , glucose	≤ 3	≤ 3
ins- <i>liuD</i> , citronellate	19	≤ 3
ins- <i>liuD</i> , isovalerate	3.3	≤ 3
ins- <i>atuF</i> , glucose	≤ 3	≤ 3
ins- <i>atuF</i> , citronellate	≤ 3	17
ins- <i>atuF</i> , isovalerate	≤ 3	39

^a Because of the presence of NADH oxidase activities in *P. aeruginosa*, significant carboxylase activities could be determined only above 3 mU/mg.

^b Wild-type strain (WT) and strains with insertion mutations (indicated by "ins" before a gene) were used.

isovalerate-grown cells, while GCCase, a key enzyme of the AtuC pathway, is not expressed. Mutant *liuD* (putative MCCase subunit) contained no or very low MCCase or GCCase activity after growth in the presence of isovalerate but showed significant GCCase activity (19 mU/mg) in citronellate-exposed cells. GCCase activity in the *atuF* mutant (putative GCCase subunit) was not detected, but high MCCase specific activity was determined in isovalerate (39 mU/mg)- and citronellate-grown cells (17 mU). These results confirm that *liuD* and *atuF* code for MCCase and GCCase, respectively.

Isolation of carboxylases and Western blot analysis. Biotin-containing proteins of wild-type cells and of the *liuD* insertion mutant were purified by avidin affinity chromatography and separated into subunits by reducing SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) (Fig. 4A to C). The identities of isolated subunits with LiuB/LiuD and AtuC/AtuF in the wild type were shown by trypsin peptide mass spectrometry (data not shown). As expected from MCCase and GCCase activities (Table 4), LiuD (MCCase biotin subunit) was present in both isovalerate- and citronellate-grown wild-type cells, while AtuC (GCCase biotin subunit) was detected only in citronellate-grown cells. No LiuD but significant AtuC signal appeared in the *liuD* mutant. In addition, a constitutively expressed carboxylase (PA5435 and PA5436 gene products) was also found, which is in agreement with earlier findings (1, 10, 20).

Identification of *atuR* as a repressor of the *atu* gene cluster. Regulation of *atu* gene cluster expression has not yet been investigated. Upstream of the *atu* gene cluster and in the direction opposite of transcription, an open reading frame (PA2885) with similarity to transcriptional regulators is located (Fig. 2). An insertion mutant in PA2885 was constructed. The direction of the pKnockout-encoded *lac* promoter was oriented in the same direction as that of PA2885, i.e., opposite that of the *atu* gene cluster so that constitutive expression of

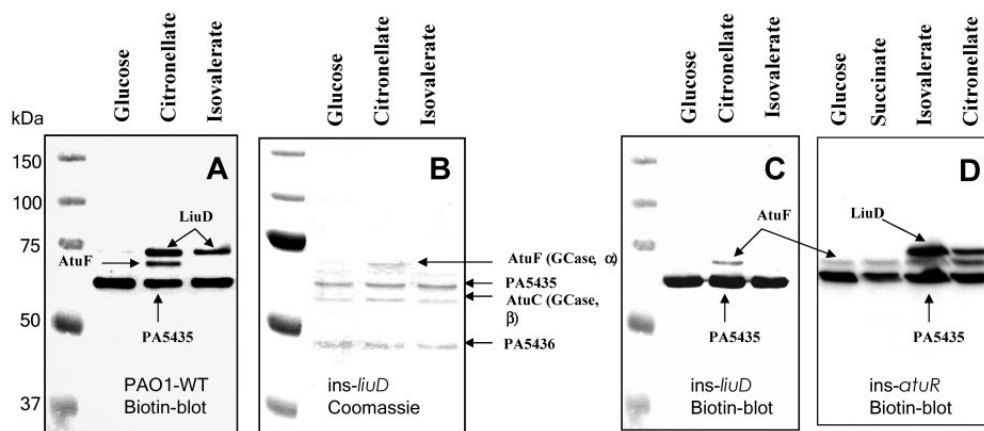


FIG. 4. Western blot analysis (A, C, and D) of *P. aeruginosa* PAO1 proteins after SDS-PAGE for biotin-containing proteins. Soluble cell extracts after avidin purification were separated on 10% SDS-polyacrylamide gels and stained with Coomassie brilliant blue (B) or transferred to polyvinylidene difluoride membranes and screened for biotin-containing proteins (A and C). Gene products identified by trypsin peptide analysis of isolated protein bands from panel B are indicated. Western blot analysis of *P. aeruginosa* PAO1 *ins-atuR* proteins after SDS-PAGE for biotin-containing proteins (D). Note the constitutive expression of Atuf. PAO1-WT, PAO1 (wild type); *ins-liuD*, insertion *liuD* mutant; *ins-atuR*, insertion *atuR* mutant.

the *atu* gene cluster from the pKnockout-encoded *lac* promoter was avoided. The insertion mutant obtained had no detectable effect on growth on any of the substrates tested (Table 2). To test whether the PA2885 gene product could act as a repressor of the *atu* gene cluster, we performed Western blotting for biotin proteins of soluble cell extracts after growth on unrelated (glucose and succinate) and related (isovalerate and citronellate) compounds and used detection of biotin-containing subunit Atuf as a marker for *atu* gene cluster expression. As shown in Fig. 4D, Atuf was constitutively expressed in the PA2885 insertion mutant on all tested substrates including succinate and glucose, while the wild type expressed Atuf only in cells grown on acyclic terpenes (Fig. 4A). LiuD (MCCase biotin-containing subunit) was still regulated as in the wild type and was expressed only in isovalerate- and citronellate-grown cells. Apparently, PA2885 is necessary to repress *atu* gene expression on unrelated carbon sources and does not influence expression of the *liu* genes. We assume that PA2885 represents a repressor of *atu* gene cluster expression and named it *atuR*.

DISCUSSION

In this study we identified six out of eight potential Atuf proteins to be specifically expressed in cells that had been grown on linear terpenes, such as citronellol or citronellate, by 2D gel electrophoresis and/or trypsin peptide analysis of isolated biotin proteins (Fig. 3 and 4). AtufD and AtufH were the only gene products of the gene cluster that were not yet identified. We assume that AtufD and AtufH were also expressed but possibly may have been overlaid by a constitutively expressed protein in the 2D picture of hundreds of spots. There was generally no visible differences in the proteome profiles of citronellol- and citronellate-grown cells; the above-mentioned Atuf proteins were present in both citronellol-grown cells and

citronellate-grown cells but not in isovalerate- or succinate-grown cells (Table 3). These results confirmed that the Atuf proteins are specific for utilization of acyclic terpenes and revealed that genes responsible for proteins that oxidize citronellol to citronellate and genes coding for catabolic steps downstream of citronellate are simultaneously expressed. A differentiation in upper and lower pathway (1, 10) appears artificially. Annotation data suggest that AtufB and/or AtufG (both probably short-chain dehydrogenases) could encode citronellol dehydrogenase and citronellal dehydrogenase and AtufH (probable acyl-CoA synthetase) citronellyl-CoA synthetase. AtufD (probable acyl-CoA dehydrogenase) could catalyze the oxidation of citronellyl-CoA to geranyl-CoA (Fig. 1). The finding that insertions in *atuG* or *atuH* or in *atuE* have no or only poor effects does not exclude the participation of the gene products in the Atuf pathway. Since the *P. aeruginosa* genome contains many genes encoding proteins with similarities to short-chain dehydrogenases, acyl-CoA synthetases, and hydratases, inactivation of *atuG*, *atuH*, and *atuE* may be compensated for by expression of isogenes resulting in suppression of a detectable phenotype. Specific expression on acyclic terpenes was shown in the proteomics experiment at least for AtufE and AtufG (Table 3).

Since *atuC*/*atuF* and *atuE* code for the two subunits of GCases and for isohexenylglutaconyl-CoA hydratase (see below), *atuA* is the only remaining gene of the gene cluster whose function remains unknown. AtufA (unknown hypothetical protein) was specifically expressed only in citronellol- and citronellate-grown cells. AtufA could be involved in transport of the substrates into the cell. However, a gene outside of the *atu* gene cluster (PA1342, putative ABC transporter together with adjacent genes, PA1339 to PA1342 [Table 3]) is more likely to be involved in transport because the PA1342 gene product was also specifically expressed in citronellol- and citronellate-

grown cells but was not visible in 2D gels of isovalerate-grown cells. The only remaining function of the *Atu* pathway (Fig. 1) is 3-hydroxy-3-isohexenylglutaryl-CoA:acetate-lyase (HHG lyase), and we speculate that *atuA* could encode the missing lyase. Insertion mutagenesis of *atuA* showed that *AtuA* is essential for a functional *Atu* pathway. There is no significant similarity of the *AtuA* amino acid sequence to any other known protein, not even to the hydroxymethylglutaryl-CoA lyase (HMG lyase, LiuE/MvaB). This may not be a surprise, because a HHG lyase gene has not been described so far and HHG lyase differs from HMG lyase in the reaction products (2, 23, 24, 27). While the former splits off an acetate molecule, the latter cleaves another carbon bond, releasing acetyl-CoA instead of acetate (29, 30). This difference might be caused by different structures of the two lyase proteins. Substrate specificity analysis of partially purified HHG lyase had shown that it cannot fulfill the function of HMG lyase *in vitro* (29, 30). It is therefore unlikely that HMG-CoA lyase (LiuE [see below]) has a dual function in the Liu and *Atu* pathway and can catalyze both lyase reactions as proposed by others (1).

Expression of four out of the five Liu proteins (LiuA, LiuB, LiuC, and LiuD) of the *liuABCDE* gene cluster was identified by 2D gel electrophoresis in cells that been grown on isovalerate, citronellol, and/or citronellate (Fig. 3 and 4 and Table 3). This indicated that the Liu proteins are essential for isovalerate utilization and are indirectly necessary for utilization of acyclic terpenes, because the *Atu* pathway concurs the Liu pathway at methylcrotonyl-CoA (Fig. 1). LiuB and LiuD have been definitively shown to encode the two subunits of MCase (Fig. 4). Comparison with the database shows that LiuC and *AtuE* both have strong similarities to many enoyl-CoA hydratases. Since the *Atu* and Liu pathway each contain one hydratase step, namely, isohexenylglutaconyl-CoA-hydratase and methylglutaconyl-CoA-hydratase (Fig. 1), and were specifically expressed during growth on citronellate (*AtuE* and LiuC) and on leucine/isovalerate (only LiuC), it is very likely that *atuE* and *liuD* encode isohexenylglutaconyl-CoA-hydratase and methylglutaconyl-CoA-hydratase, respectively.

LiuE is the only protein of the Liu gene cluster whose expression could not be shown directly in 2D gels. The LiuE amino acid sequence shows high similarities to HMG lyase of *Pseudomonas mevaloni* and other species (2). For *Rhodospirillum rubrum*, the involvement of HMG lyase in metabolism of leucine has been described elsewhere (3). On the basis of these findings, we assume that *liuE* encodes HMG lyase in *P. aeruginosa*. Only bacteria that have both the *atu* and *liu* gene clusters, such as *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* Pf-5, and *P. citronellolis*, are able to utilize citronellol. We predict that the citronellol- and isovalerate-degrading species *P. mendocina* will also have functional *atu* and *liu* gene clusters. Inspection of the database revealed that gene clusters highly similar to the *atu* gene cluster of *P. aeruginosa* are present in *Mannibacter aquaeolei* VT8 and in *Hahella chejuensis* KCTC 2396. The functions of these hypothetical proteins remain to be identified.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank R. Schäfer for assistance during transposon mutagenesis and S. Drescher and M. Panas for assistance during 2D gel electrophoresis. We also thank A. Rooney for providing *P. fluorescens* Pf-5.

This work was supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft to D.J.

REFERENCES

1. Aguilar, J. A., A. N. Zavala, C. Diaz-Perez, C. Cervantes, A. L. Diaz-Perez, and J. Campos-Garcia. 2006. The *atu* and *liu* clusters are involved in the catabolic pathways for acyclic monoterpenes and leucine in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:2070–2079.
2. Anderson, D. H., and V. W. Rodwell. 1989. Nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A lyase gene of *Pseudomonas mevaloni*. *J. Bacteriol.* **171**:6468–6472.
3. Baltischefsky, M., M. Brosche, T. Hultman, L. Lundvik, P. Nyren, Y. Sakai-Nore, A. Severin, and A. Strid. 1997. A 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase gene in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Biochim. Biophys. Acta* **1337**:113–122.
4. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248–254.
5. Burke, Y. D., M. J. Stark, S. L. Roach, S. E. Sen, and P. L. Crowell. 1997. Inhibition of pancreatic cancer growth by the dietary isoprenoids farnesol and geraniol. *Lipids* **32**:151–156.
6. Cantwell, S. G., E. P. Lau, D. S. Watt, and R. R. Fall. 1978. Biodegradation of acyclic isoprenoids by *Pseudomonas* species. *J. Bacteriol.* **135**:324–333.
7. Carnesecci, S., R. Bras-Goncalves, A. Brackia, M. Zeisel, F. Gosse, M. F. Poupon, and F. Raul. 2004. Geraniol, a component of plant essential oils, modulates DNA synthesis and potentiates 5-fluorouracil efficacy on human colon tumor xenografts. *Cancer Lett.* **215**:53–59.
8. Clauser, K. R., P. Baker, and A. L. Burlingame. 1999. Role of accurate mass measurement (± 10 ppm) in protein identification strategies employing MS or MS/MS and database searching. *Anal. Chem.* **71**:2871–2882.
9. de Lorenzo, V., M. Herrero, U. Jakubzik, and K. N. Timmis. 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.* **172**:6568–6572.
10. Diaz-Perez, A. L., A. N. Zavala-Hernandez, C. Cervantes, and J. Campos-Garcia. 2004. The *gryRDEFLAL* cluster is involved in acyclic isoprenoid degradation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:5102–5110.
11. Duncan, R. E., D. Lau, A. El-Sohemy, and M. C. Archer. 2004. Geraniol and beta-ionone inhibit proliferation, cell cycle progression, and cyclin-dependent kinase 2 activity in MCF-7 breast cancer cells independent of effects on HMG-CoA reductase activity. *Biochem. Pharmacol.* **68**:1739–1747.
12. Fall, R. R. 1981. 3-Methylcrotonyl-CoA and geranyl-CoA carboxylases from *Pseudomonas citronellolis*. *Methods Enzymol.* **71**(Part C):791–799.
13. Fall, R. R. 1976. Stabilization of an acetyl-coenzyme A carboxylase complex from *Pseudomonas citronellolis*. *Biochim. Biophys. Acta* **450**:475–480.
14. Fall, R. R., J. L. Brown, and T. L. Schaeffer. 1979. Enzyme recruitment allows the biodegradation of recalcitrant branched hydrocarbons by *Pseudomonas citronellolis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **38**:715–722.
15. Fall, R. R., and M. L. Hector. 1977. Acyl-coenzyme A carboxylases. Homologous 3-methylcrotonyl-CoA and geranyl-CoA carboxylases from *Pseudomonas citronellolis*. *Biochemistry* **16**:4000–4005.
16. Förster-Fromme, K., and D. Jendrossek. 2005. Unpublished results.
17. Guan, X., T. Diez, T. K. Prasad, B. J. Nikolau, and E. S. Wurtele. 1999. Geranyl-CoA carboxylase: a novel biotin-containing enzyme in plants. *Arch. Biochem. Biophys.* **362**:12–21.
18. Hector, M. L., and R. R. Fall. 1976. Multiple acyl-coenzyme A carboxylases in *Pseudomonas citronellolis*. *Biochemistry* **15**:3465–3472.
19. Hierro, I., A. Valero, P. Perez, P. Gonzalez, M. M. Cabo, M. P. Montilla, and M. C. Navarro. 2004. Action of different monoterpene compounds against *Anisakis simplex* s.l. L3 larvae. *Phytomedicine* **11**:77–82.
20. Höschle, B., V. Gnau, and D. Jendrossek. 2005. Methylcrotonyl-CoA carboxylase and geranyl-CoA carboxylase are involved in leucine/isovalerate utilization (Liu) and in acyclic terpenes utilization (Atu) and are encoded by *liuB/liuD* and *atuC/jatuF* in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **151**:3649–3656.
21. Höschle, B., and D. Jendrossek. 2005. Utilization of geraniol is dependent on molybdenum in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for different metabolic routes for oxidation of geraniol and citronellol. *Microbiology* **151**:2277–2283.
22. Izumi, S., O. Takashima, and T. Hirata. 1999. Geraniol is a potent inducer of apoptosis-like cell death in the cultured shoot primordia of *Matricaria chamomilla*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **259**:519–522.
23. Mizioro, H. M., and C. Narasimhan. 2000. *Pseudomonas mevaloni* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase. *Methods Enzymol.* **324**:139–149.
24. Narasimhan, C., and H. M. Mizioro. 1992. *Pseudomonas mevaloni* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase: characterization of the isolated recombinant protein and investigation of the enzyme's cation requirements. *Biochemistry* **31**:11224–11230.
25. Paulsen, I. T., C. M. Press, J. Ravel, D. Y. Kobayashi, G. S. Myers, D. V. Mavroli, R. T. DeBoy, R. Seshadri, Q. Ren, R. Madupu, R. J. Dodson, A. S. Durkin, L. M. Brinkac, S. C. Daugherty, S. A. Sullivan, M. J. Rosovitz, M. L. Gwinn, L. Zhou, D. J. Schneider, S. W. Cartinhour, W. C. Nelson, J. Weid-

- man, K. Watkins, K. Tran, H. Khouri, E. A. Pierson, L. S. Pierson III, L. S. Thomashow, and J. E. Loper. 2005. Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nat. Biotechnol.* **23**:873–878.
26. Schaffer, S., B. Weil, V. D. Nguyen, G. Dongmann, K. Gunther, M. Nickolaus, T. Hermann, and M. Bott. 2001. A high-resolution reference map for cytoplasmic and membrane-associated proteins of *Corynebacterium glutamicum*. *Electrophoresis* **22**:4404–4422.
27. Scher, D. S., and V. W. Rodwell. 1989. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A lyase from *Pseudomonas miewalonii*. *Biochim. Biophys. Acta* **1003**:321–326.
28. Seubert, W. 1960. Degradation of isoprenoid compounds by microorganisms. I. Isolation and characterization of an isoprenoid-degrading bacterium, *Pseudomonas citronellois* n. sp. *J. Bacteriol.* **79**:426–434.
29. Seubert, W., and E. Fass. 1964. Studies on the bacterial degradation of isoprenoids. IV. The purification and properties of beta-isohexenylglutacoryl-CoA-hydrolase and beta-hydroxy-beta-isohexenylglutaryl-CoA-lyase. *Biochem. Z.* **341**:22–24.
30. Seubert, W., and E. Fass. 1964. Studies on the bacterial degradation of isoprenoids. V. The mechanism of isoprenoid degradation. *Biochem. Z.* **341**:35–44.
31. Seubert, W., E. Fass, and U. Remberger. 1963. Studies on the bacterial degradation of isoprenoids. III. Purification and properties of geranyl carboxylase. *Biochem. Z.* **338**:265–275.
32. Seubert, W., and U. Remberger. 1963. Studies on the bacterial degradation of isoprenoids. II. The role of carbon dioxide. *Biochem. Z.* **338**:245–264.
33. Simon, R., U. Priefer, and A. Pühler. 1983. A broad host-range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Bio/Technology* **1**:784–791.
34. Stover, C. K., X. Q. Pham, A. L. Erwin, S. D. Mizoguchi, P. Warrener, M. J. Hickey, F. S. Brinkman, W. O. Hufnagle, D. J. Kowalik, M. Lagrou, R. L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, L. L. Brody, S. N. Coulter, K. R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G. K. Wong, Z. Wu, I. T. Paulsen, J. Reizer, M. H. Saier, R. E. Hancock, S. Lory, and M. V. Olson. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**:959–964.
35. Windgassen, M., A. Urban, and K. E. Jaeger. 2000. Rapid gene inactivation in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **193**:201–205.
36. Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**:103–119.

Anhang 3



Identification and characterization of the acyclic terpene utilization gene cluster of *Pseudomonas citronellolis*

Karin Förster-Fromme & Dieter Jendrossek

Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart, Stuttgart, Germany

Correspondence: Dieter Jendrossek, Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart, Allmandring 31, 70550 Stuttgart, Germany. Tel.: +49 711 685 65483; fax: +49 711 685 65725; e-mail: dieter.jendrossek@imb.uni-stuttgart.de

Received 20 June 2006; revised 3 August 2006; accepted 23 August 2006.
First published online 12 September 2006.

DOI:10.1111/j.1574-6968.2006.00454.x

Editor: Dieter Jahn

Keywords

citronellol; geraniol; branched-chain carbon metabolism; *Pseudomonas citronellolis*; *Pseudomonas aeruginosa*; Atu pathway.

Introduction

Citronellol, geraniol and other acyclic terpenes are frequently occurring aroma compounds of plants. They belong to the family of methyl-branched molecules derived from isoprene. Related compounds are carotenoids, steroids and polyisoprene (rubber). Leucine and isovalerate are examples of saturated molecules with a methyl-branched carbon backbone.

The degradation pathway of citronellol was investigated in *Pseudomonas citronellolis* by Seubert and by Fall and coworkers in the 60s and 70s of the last century (Seubert, 1960; Seubert & Remberger, 1963; Seubert *et al.*, 1963; Seubert & Fass, 1964a, b; Fall & Hector, 1977; Fall *et al.*, 1979; Fall, 1981). A putative pathway from citronellol to 7-methyl-3-oxo-6-octenoyl-CoA is shown in Fig. 1. The latter compound is further metabolized via β -degradation and Liu pathway (leucine and isovalerate utilization) (Höschle *et al.*, 2005; Förster-Fromme *et al.*, 2006). *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas mendocina* and *Pseudomonas fluorescens* (strain Pf-5) are the only validly described species with documented ability to utilize acyclic terpenes as a sole source of carbon and energy besides *P. citronellolis*. Recently, we were able to identify the *atu* gene cluster (acyclic terpene utilization) in *P. aeruginosa*, which harboured genes essen-

Abstract

The catabolism of citronellol and geraniol [acyclic terpene utilization (Atu) pathway] was investigated in *Pseudomonas citronellolis*. A 13.3-kb genomic DNA fragment was cloned and harboured a putative regulator gene *atuR* and a gene cluster consisting of eight genes (*atuABCDEFGH*). Sequence analysis of the *atu* gene products showed a high degree of amino acid similarity (78–91% identity) to products of a similar gene cluster previously identified in *Pseudomonas aeruginosa*. Insertion mutagenesis in *atuA* resulted in inability of the bacteria to utilize acyclic terpenes as a sole source of carbon and energy and confirmed the involvement of *atuA* in the Atu pathway. Western blot analysis of wild-type and *atuA* mutant cells of *P. citronellolis* and *P. aeruginosa* for biotin-containing proteins enabled the identification of geranyl-CoA carboxylase (GCCase), which is the key enzyme of the Atu pathway. GCCase subunits were encoded by *atuC* and *atuF*. Putative functions for the other Atu proteins in the catabolic pathway of acyclic terpenes are discussed.

tial for utilization of citronellol (Höschle *et al.*, 2005; Förster-Fromme *et al.*, 2006). Analysis of insertion mutants in *atu* genes and proteome analysis clearly showed the involvement of *atu* genes and Atu proteins for growth on acyclic terpenes such as citronellol or citronellate in *P. aeruginosa* (Aguilar *et al.*, 2006; Förster-Fromme *et al.*, 2006). However, the biochemistry of the acyclic terpene utilization (Atu) pathway was originally investigated in *P. citronellolis* (Seubert & Fass, 1964) and we were interested in identification of the respective *atu* genes in *P. citronellolis*. In a recent study, we identified *mgoB* (malate:quinone oxidoreductase) of *P. citronellolis* to be indirectly necessary for utilization of acyclic terpenes and C₂ compounds (Förster-Fromme & Jendrossek, 2005). In this contribution, we focused our interest on genes directly involved in utilization of acyclic terpenes in *P. citronellolis*.

Materials and methods

Bacterial strains and culture conditions, Western blot, two-dimensional electrophoresis

Pseudomonas citronellolis and *P. aeruginosa* PAO1 were used in this study besides *Escherichia coli*. The growth conditions

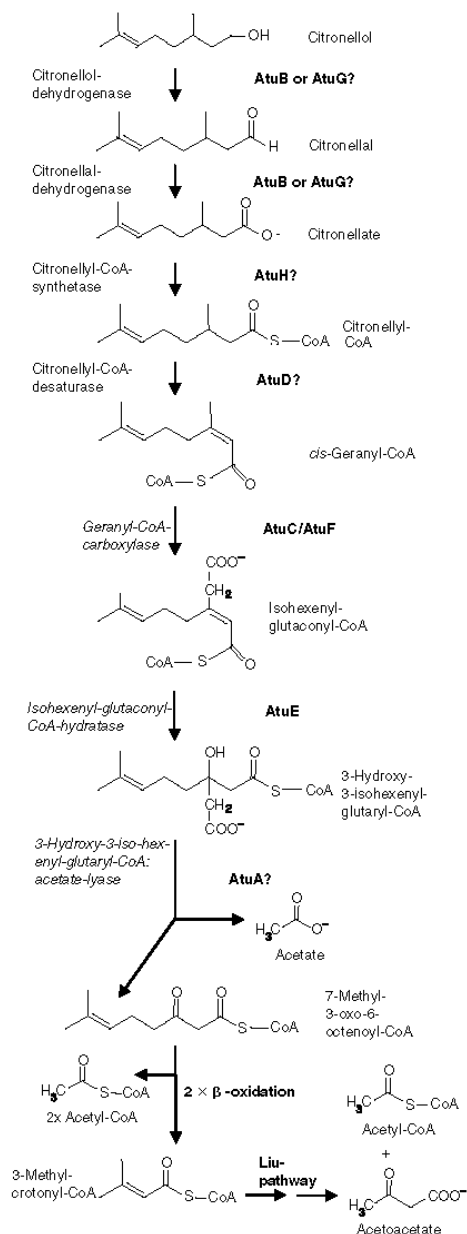


Fig. 1. Putative acyclic terpenes utilization (Atu) pathway modified from Förster-Fromme *et al.* (2006).

and details of Western blot analysis of soluble cell extracts for biotin proteins and two-dimensional gel electrophoresis were described previously (Höschle & Jendrossek, 2005; Höschle *et al.*, 2005; Förster-Fromme *et al.*, 2006).

Identification and cloning of the *atu* gene cluster of *P. citronellolis*

Genomic DNA of *P. citronellolis* was partly digested with *Mbo*I and ligated with SuperCos 1 following the manual by Stratagene. The cosmids were packed using the pWEB Cosmid Clonig Kit by Epicentre and the titre was determined (2.41×10^4 CFU mL⁻¹). Two hundred and fifty clones per agar plate were picked, grown at 37 °C overnight and were incubated at 4 °C for 2 h before the colonies were transferred to a membrane (Hybond-N+, GE Healthcare). The membranes were incubated in 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) (10 min), in 0.5 M NaOH/1.5 M NaCl (5 min) and in 0.5 M Tris HCl pH 7.4/1.5 M NaCl (5 min). The membranes were pressed between Whatman paper, incubated in 20 × SSC (3 M NaCl, 0.3 M Na-citrate, pH 7.0) for 5 min and treated with UV light (3 min). PCR-generated *atu* genes of *P. aeruginosa* PAO1 were used as digoxigenin-labelled probes in standard Southern blotting methods. One clone (SK3050) was found that reacted positive with all *atu* gene probes. The cosmid of this clone and *Pst*I-generated subclones were used for Sanger DNA sequencing. Accession numbers for *P. citronellolis* *atu* genes are DQ328851–DQ328858 (*atuA*–*atuH*) and DQ767718 (*atuR*).

Insertion mutagenesis

3′- and 5′-truncated fragment of *atuA* was obtained by PCR-mediated amplification of *atuA* from *P. citronellolis* genomic DNA using *atuA*-*Xba*I-Fw (5′-GCTCTAGAGC-TGGGCTGGAACGACT-3′) and *atuA*-*Bam*HI-Rev (5′-CGGGATCCG-CCACCAGGAAGGAGAACAGG-3′) as primers. The *Xba*I/*Bam*HI-digested purified 750 bp PCR fragment was cloned in the *Xba*I and *Bam*HI sites of pKnockout-G (Windgassen *et al.*, 2000) and transformed in *E. coli* S17-1. The plasmid pKnockout-G::*atuA* was transferred to *P. citronellolis* via conjugation with selection on mineral salts agar containing 0.5% glucose and 10 µg gentamycin mL⁻¹. Disruption of *atuA* was confirmed by Southern blot hybridization of chromosomal mutant DNA with a digoxigenin-labelled probe specific for *atuA*. Polar downstream effects of the insertion were avoided by cloning the *atuA* fragment colinear to the constitutive (in *P. citronellolis*) *lac* promoter of pKnockout-G (Windgassen *et al.*, 2000).

Complementation of *P. citronellolis* *atuA* insertion mutant

AtuA was PCR-amplified from *P. citronellolis* genomic DNA using *atuAKomp*-*Hind*III (5′-CCCAAGCTTGGG-CACGGGCAGACAATGACCAAG-3′) and *atuAKomp*-*Xba*I (5′-GCTCTAGAGC-ACAACCCGGCAACGCAAC-3′) as primers. The *Hind*III and *Xba*I digested 1864 bp fragment was ligated in pBBR1 MCS-2 and transformed in *E. coli* S17-1. In

this orientation, *atuA* was colinear to the constitutive (in *P. citronellolis*) *lac* promoter of pBBR1 MCS-2. The plasmid pBBR1 MCS-2::*atuA* was transferred to *P. citronellolis* via conjugation and selection on mineral salts agar containing 0.5% glucose and 20 µg kanamycin mL⁻¹.

Results

Identification and cloning of the *P. citronellolis* *atu* cluster

Recently, we identified and characterized an eight gene cluster (*atuABCDEFGH*) of *P. aeruginosa* including a repressor gene, *atuR* upstream of the *atu* cluster (Höschle *et al.*, 2005; Förster-Fromme *et al.*, 2006), that is essential for utilization of citronellol and related acyclic terpenes. As *P. citronellolis* and *P. aeruginosa* are closely related species, we speculated that genes necessary for citronellol utilization in *P. citronellolis* might be organized in a similar gene cluster. When a genomic cosmid library of genomic *P. citronellolis* DNA in *E. coli* was screened with digoxigenin-labelled *atu* genes of *P. aeruginosa* as a probe, a positive clone (SK3050) was obtained that hybridized with all eight *atu* genes (data not shown). The DNA sequence of the cloned DNA (13.3 kb) was determined. Analysis of the sequence revealed the presence of nine ORFs and the corresponding gene products showed high amino acid similarity (78–91% identity) to the products of the *atuRABCDEFGH* cluster of *P. aeruginosa* (Table 1). The sequential order of related genes

was exactly the same as for *P. aeruginosa* (*atuABCDEFGH*) with *atuR* upstream and in the opposite direction of transcription of the cluster, suggesting that the *atu* gene cluster of *P. citronellolis* is very similar to that of *P. aeruginosa*. (Fig. 2). Potential *atu* clusters were also identified in *Hahella chejuensis* KCTC 2396 and *Marinobacter aquaeolei* VT8 by database search.

Properties of *atu* genes

Inspection of the putative functions assigned to the individual *atu* genes showed plausible functions in the *Atu* pathway for *atu* genes (Fig. 1; Table 1). *AtuC* and *AtuF* encode the two subunits of GCCase, and *AtuE* corresponds to isohexenylglutaconyl-CoA hydratase. *AtuB*, *AtuD* and *AtuG* have high similarities to dehydrogenases and probably encode dehydrogenases/desaturases of the *Atu* pathway (Fig. 1; Table 1). So far, we cannot attribute a particular dehydrogenase function to the three gene products. *AtuH* may be important to activate citronellate to the corresponding thioester. *AtuA* has no significant similarity to any protein of the database with known function.

AtuA is necessary for utilization of citronellol

To investigate whether the *atu* cluster of *P. citronellolis* and in particular *atuA* is necessary for citronellol utilization, we constructed an insertion mutant in *atuA* as described in the materials and methods section. The resulting insertion mutant was unable to grow on citronellol, geraniol,

Table 1. Properties, similarities (% identity) and putative function of *atu* genes and corresponding gene products in pseudomonads

	<i>P. citronellolis</i> MW (kDa)	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 MW (kDa) identities to <i>P. citronellolis</i>	<i>P. fluorescens</i> Pf-5 MW (kDa) identities to <i>P. citronellolis</i>	Putative function according to database search	Putative function in terpene utilization
<i>AtuR</i>	22.125	22.057 90%	23.091 81%	Regulatory protein, tetR family	Repressor of <i>atu</i> -cluster
<i>AtuA</i>	63.213	64.436 84%	63.508 77%	Hypothetical protein	Unknown (possibly 3-hydroxy-3-iso-hexenylglutaryl-CoA: acetate-lyase)
<i>AtuB</i>	30.518	30.751 90%	30.406 85%	Short-chain dehydrogenase	Citronellol/citronellal dehydrogenase
<i>AtuC</i>	57.192	57.328 91%	57.584 81%	Biotin-dependent carboxylase, β-subunit	Geranyl-CoA-carboxylase, β-subunit
<i>AtuD</i>	42.679	42.714 88%	42.744 88%	Acyl-CoA dehydrogenase	Citronellyl-CoA desaturase
<i>AtuE</i>	27.467	27.718 82%	28.206 72%	EnolylCoA hydratase/isomerase	Isohexenyl-glutaconyl-CoA-hydratase
<i>AtuF</i>	71.330	71.748 78%	70.560 69%	Biotin-dependent carboxylase, α-subunit	Geranyl-CoA-carboxylase α-subunit (biotin-containing)
<i>AtuG</i>	29.537	29.631 86%	<i>atuG</i> is not present in <i>P. fluorescens</i> Pf-5	Short-chain dehydrogenase	Citronellol/citronellal dehydrogenase
<i>AtuH</i>	67.259	67.648 82%	<i>atuH</i> is not present in <i>P. fluorescens</i> Pf-5	Very long-chain acyl-CoA synthetase	Citronellyl-CoA-synthetase

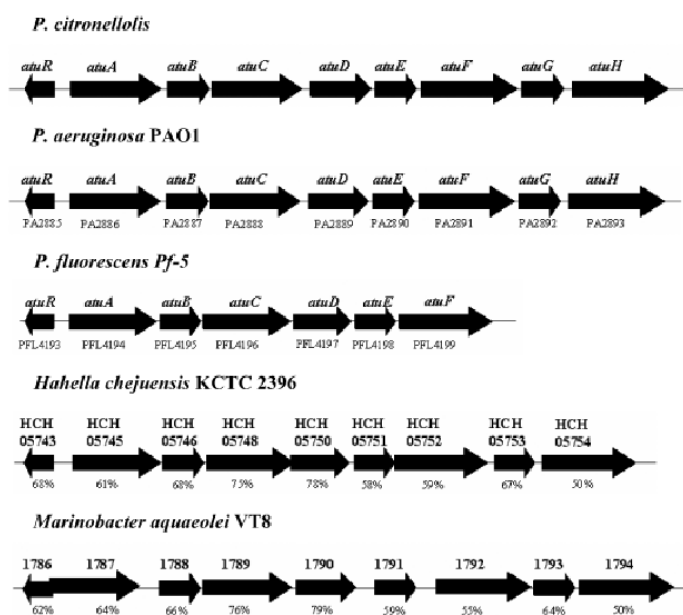


Fig. 2. Comparison of *atu* gene clusters of *Pseudomonas citronnellolis*, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and *Pseudomonas fluorescens* Pf-5, *Hahella chejuensis* KCTC 2396 and *Marinobacter aquaeolei* VT8. Identities of the putative *H. chejuensis* and *M. aquaeolei* *atu* gene products to the *atu* gene products of *P. citronnellolis* are given below.

citronellate or geranylate but could not be distinguished from the wild type on glucose, succinate, leucine or isovalerate. As *P. citronnellolis* wild type is able to grow on leucine and on isovalerate, the bacteria obviously have a functional leucine/isovalerate-utilizing (Liu) pathway (Förster-Fromme *et al.*, 2006). We concluded that *atuA* is essential for growth on acyclic terpenes but is not necessary for an operating Liu pathway.

AtuA is the first gene of the eight genes comprising the *atuABCDEFHG* gene cluster. To exclude that a polar effect of the insertion in *atuA* on the downstream located genes is responsible for the observed phenotype, the insertion with pKnockout was constructed in a manner that the plasmid-encoded *lac* promoter was orientated colinear to the orientation of transcription of the *atu* gene cluster. The *lac* promoter is constitutively expressed in *Pseudomonas* and should lead to the constitutive expression of genes located downstream of the insertion site. To verify this assumption and to find further evidence for the involvement of other *atu* genes in the catabolic pathway of acyclic terpenes in *P. citronnellolis*, we investigated expression of biotin-containing proteins in wild type and *atuA* insertion mutant cells. *AtuF* encodes the biotin subunit of GCCase in *P. aeruginosa* and presumably also in *P. citronnellolis*, and detection of *AtuF* was taken as an indicator for expression of *atu* gene products. Figure 3 shows the results of a Western blot of soluble proteins of *P. citronnellolis* and *P. aeruginosa*. A constitutively expressed carboxylase (70 kDa) apparently unrelated to methyl-branched metabolism was identified in *P. citronnellolis* wild type

(Fig. 3a) and *atuA* insertion mutant (Fig. 3b) and corresponds to a constitutively expressed carboxylase unrelated to terpene metabolism (PA5435) in *P. aeruginosa* (Fig. 3c and d). Isovalerate-grown wild-type cells harboured an additional biotin protein at about 73 kDa. This protein corresponds to the biotin subunit of methylcrotonyl-CoA carboxylase (MCCase) *LiuD* in *P. aeruginosa* and other species. Citronellate-grown cells also contain MCCase (*LiuD*) but harboured an additional biotin-containing protein of almost the same apparent molecular mass (75 kDa) corresponding to GCCase subunit *AtuF* of *P. aeruginosa*. It was hardly possible to separate *AtuF* from *LiuD* of *P. citronnellolis* even after prolonged time of electrophoresis or using different concentrations of acrylamide (data not shown); it was necessary to apply two-dimensional gel electrophoresis for efficient separation of biotin proteins (Fig. 3e1, f1). Our data are in agreement with the presence of MCCase activity in leucine/isovalerate-grown cells and both MCCase and GCCase activity in citronellate-grown *P. citronnellolis* cells (Hector & Fall, 1976). Figure 3b, e2, f2 show the same biotin blot for the *atuA* insertion mutant. As the mutant is unable to grow with citronellate as the sole source of carbon and energy, the culture contained 0.075% glucose in addition to 0.2% citronellate. In contrast to the wild type, the *atuA* insertion mutant expressed *AtuF* (GCCase) constitutively at a low level, confirming the function of the pKnockout-encoded (constitutive) *lac* promoter. Isovalerate-grown cells contained *LiuD* (MCCase) comparable to the wild type. As insertion in *atuA* led to inability of the cells to grow on citronellate although the downstream located *atuF* was expressed constitutively, we conclude that *atuA* is

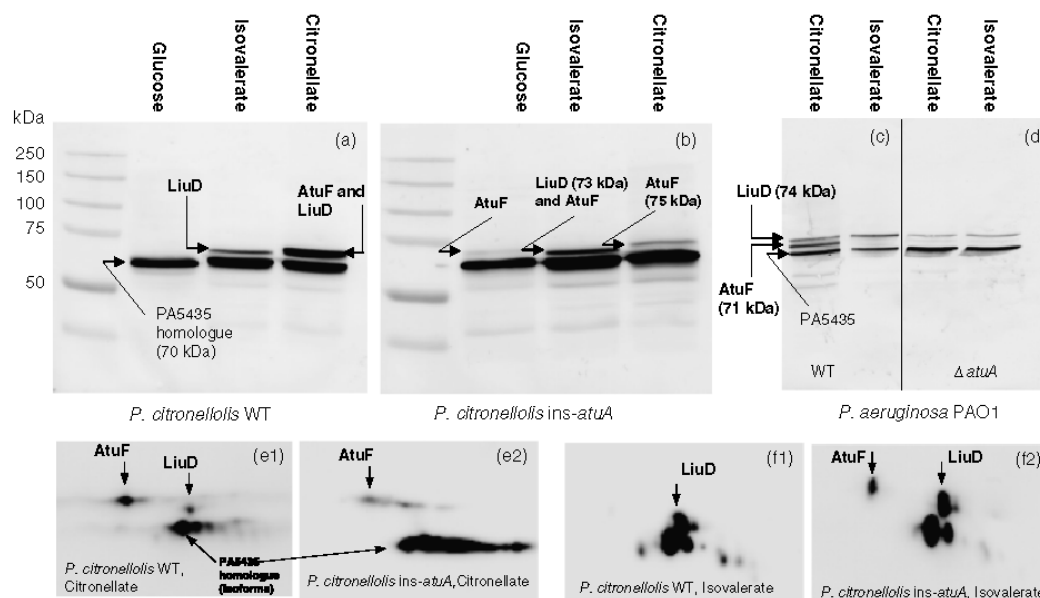


Fig. 3. Western blot analysis of *Pseudomonas citronellolis* and *Pseudomonas aeruginosa* proteins after SDS-PAGE for biotin-containing proteins. One-dimensional SDS gel electrophoresis (a–d) and two-dimensional gel electrophoresis (e, f). To obtain sufficient resolution in the above range, 50 kDa electrophoresis was carried out for about 90 min (20–25 mA) so that proteins of less than \approx 25 kDa had run out of the gel. Note that AtuF and LiuD of *P. citronellolis* have almost the same R_f value and could hardly be separated. *Pseudomonas citronellolis* wild type (a), *P. citronellolis ins-atuA* (b), *P. aeruginosa* PAO1 (c), *P. aeruginosa* PAO1 Δ atuA (d). Two-dimensional gel electrophoresis and subsequent Western blotting for biotin proteins of *P. citronellolis* (e, f). Figures (e) and (f) show only the relevant parts of highly enlarged gels. Note that AtuF and LiuD of *P. citronellolis* and *P. aeruginosa* migrate slightly differently during SDS-gel electrophoresis.

essential for growth on acyclic terpenes such as citronellol or citronellate. A similar result was obtained for the *atuA* gene of *P. aeruginosa* (Fig. 3c and d). A deletion mutant within *atuA* was constructed in *P. aeruginosa* (Hoang *et al.*, 1998) and resulted in the same minus phenotype for acyclic terpenes (data not shown). However, expression of the downstream genes was negatively affected in the deletion mutant as revealed by the absence of the expected biotin bands (AtuF) in Western blot of citronellate-exposed mutant cell extracts (Fig. 3d). We conclude that insertion mutagenesis with the pKnockout plasmid that harboured the constitutive (in *P. aeruginosa* and *P. citronellolis*) *lac* promoter is better to study the effect of a single gene inactivation event than a deletion.

To test whether the observed phenotype of the *atuA* mutant in *P. citronellolis* is really caused by a single insertion event in *atuA*, an intact copy of *atuA* was cloned into pBBR1 MCS-2 and transferred to the *P. citronellolis atuA* insertion mutant. The mutant transconjugant with *atuA in trans* was able to utilize citronellol, geraniol, citronellate or geranylate as a single source of carbon and energy, and confirmed that *AtuA* is essential for growth on acyclic terpenes. However, growth on acyclic terpenes but not on isovalerate was slowest compared with the wild type. This indicates that low-level

constitutive expression of the *atu* genes downstream of *atuA* became growth limiting in the *atuA* insertion mutant.

Discussion

In this study, we cloned the *atuR-atuABCDEFGH* gene cluster of *P. citronellolis*. The number and relative orientation of all *atu* genes was the same as for *P. aeruginosa*, and a high degree of amino acid sequence similarities (78–91% identity; Table 1) of the *atu* gene products to the respective gene products in *P. aeruginosa* was found. Biotin-containing proteins including GCCase and MCCase, the key enzymes of the *Atu* and *Liu* pathway, were expressed specifically in citronellate- and citronellate or isovalerate-grown cells as it has been found in *P. aeruginosa*. The involvement of the *atu* genes in acyclic terpene catabolism was exemplarily confirmed for *atuA* by insertion mutagenesis and phenotype determination. We conclude that the *atu* genes in *P. citronellolis* have the same function as in *P. aeruginosa*. Interestingly, *H. chejuensis* KCTC 2396 and *M. aqueolei* VT8 also have *atu* genes (Fig. 2) with high similarities (50–79% identity on amino acid level) to *P. citronellolis atu* genes. Both species also belong to the gamma subclass of the

Proteobacteria but are marine organisms requiring NaCl for growth (Huu *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2001). From the high similarity values of the postulated *atu* gene products of *H. chejuensis* and *M. aquaeolei* to *atu* gene products of *Pseudomonas*, we assume that the two species can also utilize acyclic terpenes as carbon sources, showing that the *Atu* pathway is present not only in soil and in fresh water but also in marine ecosystems.

The *Atu* pathway consists of seven enzymatic steps (Fig. 1). The *atu* gene cluster harbours eight genes encoding seven proteins (GCase consists of two subunits). Six of the seven *Atu* proteins (except *AtuH*) have been found to be specifically expressed in acyclic terpene-grown cells of *P. aeruginosa* by proteome analysis (Förster-Fromme *et al.*, 2006). Therefore, it is likely that each of the *atu* genes contributes to one of the individual steps. Table 1 shows the properties of the individual *Atu* proteins. The putative functions are supported by high amino acid similarity values to protein with known functions. Only for *AtuA* no function could be addressed by database search. We speculate that *AtuA* encodes 3-hydroxy-3-iso-hexenyl-glutaryl-CoA acetate lyase (HHG lyase) as this is the only enzyme whose function is not covered by any of the other *Atu* proteins. As an HHG lyase sequence has never been described before and differs from 3-hydroxymethylglutaryl-CoA lyase (HMG lyase, LiuE, Förster-Fromme *et al.*, 2006) in the reaction products (Seubert & Fass, 1964b), it is not surprising that significant amino acid similarities to proteins of the database are missing. It will be necessary to find experimental evidence for the lyase activity of *AtuA* in future.

Acknowledgement

This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft.

References

- Aguilar JA, Zavala AN, Diaz-Perez C, Cervantes C, Diaz-Perez AL & Campos-Garcia J (2006) The *atu* and *liu* clusters are involved in the catabolic pathways for acyclic monoterpenes and leucine in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* **72**: 2070–2079.
- Fall RR (1981) 3-Methylcrotonyl-CoA and geranyl-CoA carboxylases from *Pseudomonas citronellolis*. *Methods Enzymol* **71**: (Part C): 791–799.
- Fall RR & Hector ML (1977) Acyl-coenzyme A carboxylases. Homologous 3-methylcrotonyl-CoA and geranyl-CoA carboxylases from *Pseudomonas citronellolis*. *Biochemistry* **16**: 4000–4005.
- Fall RR, Brown JL & Schaeffer TL (1979) Enzyme recruitment allows the biodegradation of recalcitrant branched hydrocarbons by *Pseudomonas citronellolis*. *Appl Environ Microbiol* **38**: 715–722.
- Förster-Fromme K & Jendrossek D (2005) Malate: quinone oxidoreductase (*MqoB*) is required for growth on acetate and linear terpenes in *Pseudomonas citronellolis*. *FEMS Microbiol Lett* **246**: 25–31.
- Förster-Fromme K, Höschle B, Mack C, Bott M, Armbruster W & Jendrossek D (2006) Identification of genes and proteins necessary for catabolism of acyclic terpenes and leucine/isovalerate in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* **72**: 4819–4828.
- Hector ML & Fall RR (1976) Multiple acyl-coenzyme A carboxylases in *Pseudomonas citronellolis*. *Biochemistry* **15**: 3465–3472.
- Hoang TT, Karkhoff-Schweizer RR, Kutchma AJ & Schweizer HP (1998) A broad-host-range *Flp-FRT* recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* **212**: 77.
- Höschle B & Jendrossek D (2005) Utilization of geraniol is dependent on molybdenum in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for different metabolic routes for oxidation of geraniol and citronellol. *Microbiology* **151**: 2277–2283.
- Höschle B, Gnau V & Jendrossek D (2005) Methylcrotonyl-CoA carboxylase and geranyl-CoA carboxylase are involved in leucine/isovalerate utilisation (*Liu*) and in acyclic terpenes utilisation (*Atu*) and are encoded by *liuB/liuD* and *atuC/atuF* in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **151**: 3649–3656.
- Huu NB, Denner EB, Ha DT, Wanner G & Stan-Lotter H (1999) *Marinobacter aquaeolei* sp. Nov., a halophilic bacterium isolated from a Vietnamese oil-producing well. *Int J Syst Bacteriol* **49**: 367–375.
- Lee HK, Chun J, Moon EY, Ko SH, Lee DS, Lee HS & Bae KS (2001) *Hahella chejuensis* gen. Nov., sp. Nov., an extracellular-polysaccharide-producing marine bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 661–666.
- Seubert W (1960) Degradation of isoprenoid compounds by microorganisms. I. Isolation and characterization of an isoprenoid-degrading bacterium, *Pseudomonas citronellolis* n. sp. *J Bacteriol* **79**: 426–434.
- Seubert W & Fass E (1964a) Studies on the bacterial degradation of isoprenoids. V. The mechanism of isoprenoid degradation. *Biochem Z* **341**: 35–44.
- Seubert W & Fass E (1964b) Studies on the bacterial degradation of isoprenoids. IV. The purification and properties of beta-isohexenylglutacoyl-CoA-hydratase and beta-hydroxy-beta-isohexenylglutaryl-CoA-lyase. *Biochem Z* **341**: 23–34.
- Seubert W & Remberger U (1963) Studies on the bacterial degradation of isoprenoids. II. The role of carbon dioxide. *Biochem Z* **338**: 245–264.
- Seubert W, Fass E & Remberger U (1963) Studies on the bacterial degradation of isoprenoids. III. Purification and properties of geranyl carboxylase. *Biochem Z* **338**: 265–275.
- Windgassen M, Urban A & Jaeger KE (2000) Rapid gene inactivation in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* **193**: 201–205.

Anhang 4

Microbiology (2008), 154, 789–796

DOI 10.1099/mic.0.2007/014530-0

Correspondence
Dieter Jendrossek
dieter.jendrossek@imb.
uni-stuttgart.de

Received 31 October 2007
Revised 18 December 2007
Accepted 21 December 2007

Biochemical characterization of AtuD from *Pseudomonas aeruginosa*, the first member of a new subgroup of acyl-CoA dehydrogenases with specificity for citronellyl-CoA

Karin Förster-Fromme, Ava Chattopadhyay and Dieter Jendrossek

Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart, Allmandring 31, 70550 Stuttgart, Germany

The *atuRABCDEFHG* gene cluster is essential for acyclic terpene utilization (Atu) in *Pseudomonas aeruginosa*. The biochemical functions of most Atu proteins have not been experimentally verified; exceptions are *AtuC/AtuF*, which constitute the two subunits of geranyl-CoA carboxylase, the key enzyme of the Atu pathway. In this study we investigated the biochemical function of *AtuD* and of the PA1535 gene product, a protein related to *AtuD* in amino acid sequence. 2D gel electrophoresis showed that *AtuD* and the PA1535 protein were specifically expressed in cells grown on acyclic terpenes but were absent in isovalerate- or succinate-grown cells. Mutant analysis indicated that *AtuD* but not the product of PA1535 is essential for acyclic terpene utilization. *AtuD* and PA1535 gene product were expressed in recombinant *Escherichia coli* and purified to homogeneity. Purified *AtuD* showed citronellyl-CoA dehydrogenase activity (V_{max} 850 mU mg⁻¹) and high affinity to citronellyl-CoA (K_m 1.6 μ M). *AtuD* was inactive with octanoyl-CoA, 5-methylhex-4-enoyl-CoA or isovaleryl-CoA. Purified PA1535 gene product revealed high citronellyl-CoA dehydrogenase activity (V_{max} 2450 mU mg⁻¹) but had significantly lower affinity than *AtuD* to citronellyl-CoA (K_m 18 μ M). Purified PA1535 protein additionally utilized octanoyl-CoA as substrate (V_{max} 610 mU mg⁻¹; K_m 130 μ M). To our knowledge *AtuD* is the first acyl-CoA dehydrogenase with a documented substrate specificity for terpenoid molecule structure and is essential for a functional Atu pathway. Potential other terpenoid-CoA dehydrogenases were found in the genomes of *Pseudomonas citronellolis*, *Marinobacter aquaeolei* and *Hahella chejuensis* but were absent in non-acyclic terpene-utilizing bacteria.

INTRODUCTION

Citronellol and related acyclic (mono)terpenes are naturally occurring compounds in plants and are commonly used as insect repellents (Hierro *et al.*, 2004) and in the cosmetic and/or food industry. The catabolic pathway of low-molecular-mass compounds with methyl-branched carbon skeletons in micro-organisms is poorly understood. Some information exists on conversion of terpenes under anaerobic conditions (Harder & Probian, 1995; Hylemon & Harder, 1998). Acyclic terpenes such as geranyl have been described as metabolites of cyclic terpene-utilizing anaerobes (Heyen & Harder, 2000). Aerobically, citronellol can be used as a single source of carbon and energy only by *Pseudomonas citronellolis* (Seubert, 1960; Seubert *et al.*, 1963; Seubert & Remberger, 1963; Seubert & Fass, 1964a, b)

Abbreviation: Atu, acyclic terpene utilization.

A sequence alignment of *AtuD*, the PA1535 gene product and *Megasphaera elsdenii* butyryl-CoA dehydrogenase is available as a supplementary figure with the online version of this paper.

and a few related species such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas mendocina* (Cantwell *et al.*, 1978) and *Pseudomonas delhiensis* (Prakash *et al.*, 2007). Recently, phytol-utilizing and isoprenoid wax ester-accumulating *Marinobacter* strains were described (Holtzapfel & Schmidt-Dannert, 2007). The most information on biochemical pathways of acyclic terpenes in aerobes exists for *P. aeruginosa* and *P. citronellolis*: in our previous studies we identified the *atuRABCDEFHG* gene cluster of *P. aeruginosa* (Förster-Fromme *et al.*, 2006; Höschle *et al.*, 2005) and a highly similar *atuRABCDEFHG* gene cluster in *P. citronellolis* (Förster-Fromme & Jendrossek, 2006) that were essential for acyclic terpene utilization (Atu) in both species. *atuC* and *atuF* were identified to encode the two subunits of the key enzyme of the Atu pathway, geranyl-CoA carboxylase (Aguilar *et al.*, 2006; Höschle *et al.*, 2005). It is assumed that the *atu* gene cluster codes for proteins catalysing the conversion of acyclic terpenes such as citronellol into 7-methyl-3-oxo-6-octenoyl-CoA (Fig. 1). 7-Methyl-3-oxo-6-octenoyl-CoA is subsequently metabolized in *P. aeruginosa*

K. Förster-Fromme, A. Chattopadhyay and D. Jendrossek

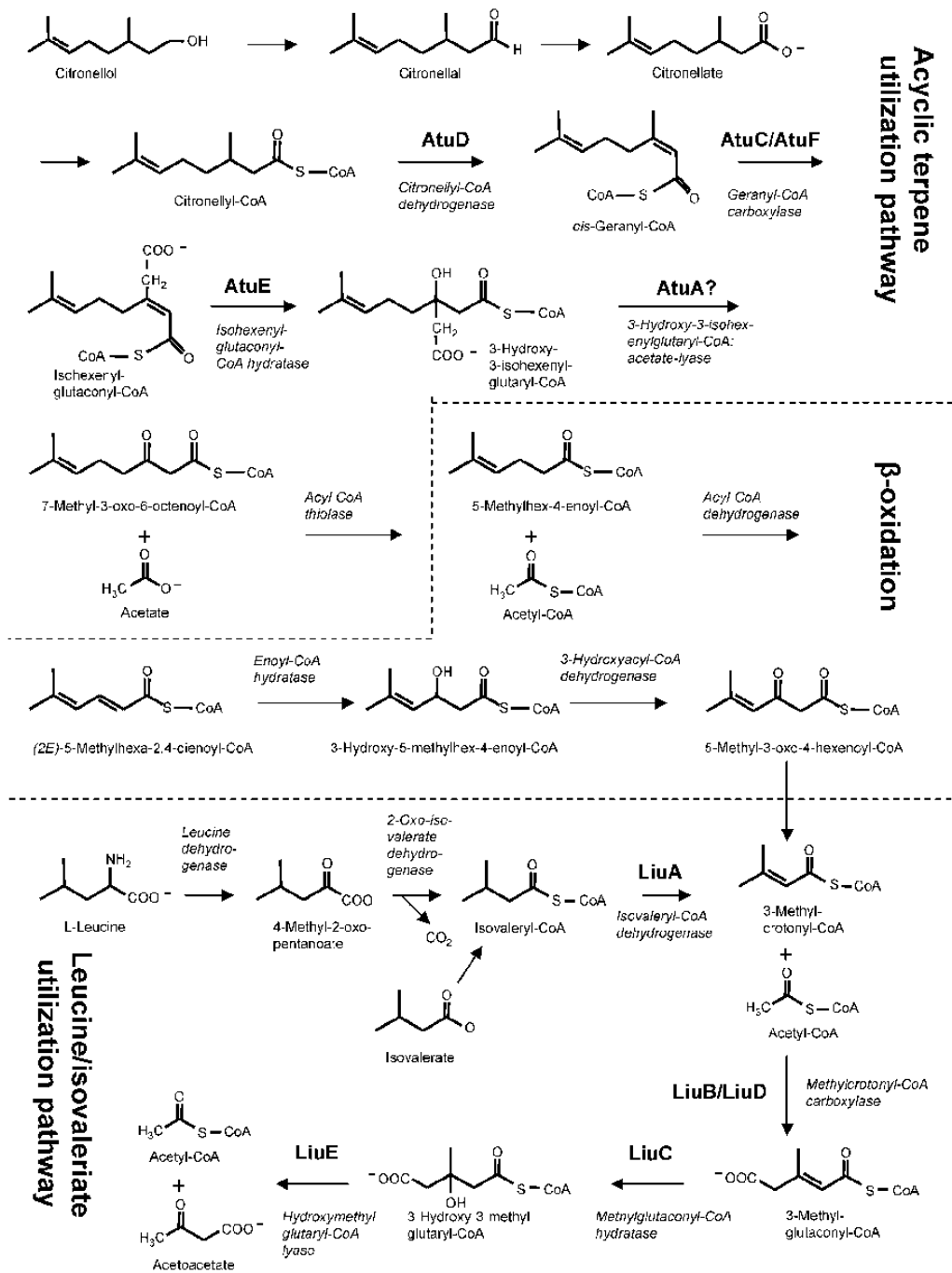


Fig. 1. Biochemical pathway of citronellol in *Pseudomonas aeruginosa* and *P. citronellolis* according to (Förster-Fromme *et al.*, 2006; Seubert & Fass, 1964a)

and *P. citronellois* by β -oxidation and the leucine/isovalerate utilization (Liu) pathway (Aguilar *et al.*, 2006; Förster-Fromme *et al.*, 2006). In this study we continued our investigation on catabolism of methyl-branched compounds and analysed the biochemical function of two FAD-dependent acyl-CoA dehydrogenases encoded by *atuD* and PA1535, respectively. Acyl-CoA dehydrogenases such as isovaleryl-CoA dehydrogenase are well-characterized enzymes from eukaryotic species (Matsubara *et al.*, 1989) but there are few biochemical data for the bacterial counterparts. To our knowledge, acyl-CoA dehydrogenases specific for terpenoid carbon skeleton have not been described before.

METHODS

Bacterial strains, plasmids and culture conditions. The bacterial strains and plasmids used in this study are shown in Table 1. *P. aeruginosa* PAO1 was routinely grown in mineral salts medium (Schlegel *et al.*, 1961) containing different carbon sources [0.5% (w/v) glucose, 0.6% (w/v) succinate or 0.1% (v/v)/(w/v) terpene (citronellol, geraniol, citronellal, geraniol, sodium salts of citronellate, geranylate or isovalerate)] at 30 °C. Water-insoluble carbon sources (citronellol, geraniol, citronellal, geraniol) were added in the space between the Petri dish and the agar (20 μ l per plate) and the plates were sealed with Parafilm. Growth on solid media with liquid carbon sources was performed in separate incubators to avoid cross-contamination by vapours. *Escherichia coli* strains were grown in Luria-Bertani (LB) medium at 37 °C.

Insertion mutagenesis. Disruption of PA1535 was carried out using pKnockout-G for rapid gene inactivation in *P. aeruginosa* as described previously (Förster-Fromme *et al.*, 2006). Correctness of the respective insertion event was verified by PCR using one gene-specific and one

pKnockout-specific primer (data not shown). Polar downstream effects were reduced by selection of those mutants in which the constitutive (in *P. aeruginosa*) *lac* promoter of pKnockout was orientated collinear to the respective gene cluster.

Construction of expression plasmids. The *atuD* and PA1535 genes of *P. aeruginosa* PAO1 were amplified using *Pwo* polymerase (Genaxxon) and *atuDFw* (5'-GGAATCCATATGATCTTCACC-CAGGAACACGAGG-3'), *atuDRev* (5'-CCCAAGCTTGGGGGGT-CCAGCAGCAGGGTCTCG-3'), PA1535Fw (5'-GGAATCCATA-TGACTGACTTCCAGCAGTACTTCGAC-3') and PA1535Rev (5'-CCCAAGCTTGGGGGGCATTACGACCTGGACTT-3') as primers, inserting a restriction site of *Nde*I and *Hind*III for later cloning. The PCR products were digested, cloned into pET28a and transformed into *E. coli* JM109. The correctness of the gene sequences was checked by DNA sequencing. The resulting constructs encoded N-terminal His-tagged AtuD and PA1535 protein and were transformed into *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS RARE for expression experiments.

Expression and purification of acyl-CoA dehydrogenases. Cultures (400 ml) of *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS RARE/pET28a::*atuD*, *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS RARE/pET28a::PA1535 and *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS RARE/pET28a as control in LB medium were incubated at 30 °C in the presence of 1 μ g riboflavin ml⁻¹ on a rotary shaker. IPTG (1 mM) was added at an OD₆₀₀ of ~0.6 for induction of gene expression and cells were collected after 3–4 h incubation by centrifugation at 4 °C and 5000 g. The cells were resuspended in 1 ml 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8, per g prior to disruption by 2 \times 30 s sonification. Cell debris was removed by centrifugation at 80 000 g for 1 h at 4 °C. The supernatants were loaded on a Ni-agarose column to purify AtuD or PA1535 protein by affinity chromatography. The column (1 ml bed volume) was washed with 4 bed volumes of 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8, and 4 bed volumes of 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8. Elution was performed using the same washing buffer with

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Reference or source
<i>E. coli</i> JM109	Cloning strain	Yanisch-Perron <i>et al.</i> (1985)
<i>E. coli</i> Rosetta 2 (DE3) pLysS RARE	Expression strain with self-lysis plasmid	Novagen
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Wild-type; utilizes citronellol, isovalerate	ATCC 15692
<i>P. aeruginosa</i> PAO1 Sm ^r	Spontaneous streptomycin-resistant mutant of PAO1 ($\geq 500 \mu\text{g ml}^{-1}$), Sm ^r	Höschle & Jendrossek (2005)
PAO1 Sm ^r ins- <i>atuD</i>	Insertion in <i>atuD</i> ; Sm ^r Gm ^r	Förster-Fromme <i>et al.</i> (2006)
PAO1 Sm ^r ins-PA1535-SK3279	Insertion in PA1535; Sm ^r Gm ^r ; collinear orientation of <i>lac</i> promoter relative to <i>atu</i> genes	This study
PAO1 Sm ^r ins-PA1535-SK3280	Insertion in PA1535; Sm ^r Gm ^r ; reverse orientation of <i>lac</i> promoter	This study
PAO1 ISlacZ/hah-PA1535-1	Transposon mutant; transposon insertion at position 428 of the PA1535 ORF	Jacobs <i>et al.</i> (2003)
PAO1 ISlacZ/hah-PA1535-2	Transposon mutant; transposon insertion at position 173 of the PA1535 ORF	Jacobs <i>et al.</i> (2003)
PAO1 ins-PA1535/ins- <i>atuD</i> -SK3543	pKnockout insertion in <i>atuD</i> in PAO1 ISlacZ/hah-PA1535-2 background	This study
PAO1 Sm ^r ins- <i>lhuA</i>	Insertion in <i>lhuA</i> ; Sm ^r Gm ^r	This study
pKnockout-G	Suicide vector for rapid gene inactivation in <i>P. aeruginosa</i>	Windgassen <i>et al.</i> (2000)
pKnockout-G::PA1535	Including a 3'- and 5'-truncated fragment of PA1535; Amp ^r Gm ^r	This study
pET28a	Expression vector	Novagen
pET28a:: <i>atuD</i>	<i>atuD</i> under control of T7 promoter	This study
pET28a::PA1535	PA1535 under control of T7 promoter	This study

K. Förster-Fromme, A. Chattopadhyay and D. Jendrossek

increasing concentrations of imidazole (4 bed volumes each with 50, 100, 250 and 500 mM imidazole). The fractions were analysed by reducing (mercaptoethanol) SDS-PAGE and the elution fractions containing the protein of interest were desalted using PD-10 desalting columns (GE Healthcare) equilibrated with 100 mM HEPES, pH 7.5.

Assay for acyl-CoA dehydrogenases and determination of K_m values. Acyl-CoA dehydrogenase activities were measured by reduction of 2,6-dichlorophenolindophenol (DCPIP) at 600 nm and 30 °C as described by Engel (1981) with some modifications. The assay mixture contained, in 1 ml, 100 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, 15 μ l 10 mM DCPIP, 10 μ l 10 mM phenazine methosulfate and 5–10 μ l enzyme solution (~1.5–6.0 μ g). Addition of FAD to the reaction mixture in some experiments did not change enzyme activity and was therefore omitted in routine assays. The assay was started by adding acyl-CoA at different concentrations for determination of V_{max} and K_m values. Calculation of the V_{max} and K_m values was performed using Lineweaver–Burk and Michaelis–Menten plots. The absorption coefficient of DCPIP was 22 mM⁻¹ cm⁻¹. One unit (U) corresponds to conversion of one μ mol CoA compound per minute.

Synthesis of acyl-CoA and HPLC-(ESI)MS determination of CoA compounds. Octanoyl-CoA and isovaleryl-CoA were from Sigma. 5-Methylhex-4-enoic acid was a gift from Chris Braddock, Imperial College, London, UK. Synthesis of citronellyl-CoA and 5-methylhex-4-enoyl-CoA was done by the mixed-anhydride method: 770 μ mol acyl compound (free acid) was dissolved in 5.1 ml tetrahydrofuran and neutralized by adding an equimolar amount of triethylamine. Then 770 μ mol ethylchloroformate was added and the mixture was stirred for 30 min at room temperature before the solution was filtered through glass wool. The filtrate containing the anhydride was added dropwise to 29 μ mol coenzyme A (CoA, Calbiochem) that had been dissolved in 12 ml water/tetrahydrofuran (3:2, v/v), pH 8.0 (with solid NaHCO₃). After stirring for 25 min, 4 ml water was added and the solution was adjusted to pH 3 with 2 M HCl. To remove remaining mixed anhydride the solution was extracted three times with diethyl ether. The aqueous phase was dried by lyophilization. The products were analysed by HPLC-(ESI)MS as described previously (Förster-Fromme *et al.*, 2006).

Other methods. 2D gel electrophoresis and identification of selected protein spots were performed with citronellate-, isovalerate-, succinate- and glucose-grown cells as described previously (Förster-Fromme *et al.*, 2006). Protein determination was done using the Bradford method (Bradford, 1976).

RESULTS

Utilization of acyclic terpenes (e.g. citronellol) as sole source of carbon and energy requires the function of the acyclic terpene utilization (Atu) pathway in *P. aeruginosa* and the closely related *P. citronellois* (Fig. 1). The key step of the Atu pathway, the carboxylation of the branched methyl group by geranyl-CoA carboxylase to an acetate function that can be cleaved off in a lyase reaction, is catalysed by the *atuC/atuF* gene products (Höschle *et al.*, 2005). The substrate for the carboxylase reaction is presumably generated by oxidation of citronellyl-CoA to geranyl-CoA via citronellyl-CoA dehydrogenase (Seubert & Fass, 1964a). The recently identified *atuRABCDEF* gene cluster harbours one gene, *atuD*, that had been annotated as potential acyl-CoA dehydrogenase and we speculated that *atuD* could encode a protein with citronellyl-CoA

dehydrogenase activity. *AtuD* was identified in 2D gel electrophoresis gels of citronellate-grown cells but was absent or below detection limit in isovalerate- and succinate-grown cells. Interestingly, 2D gel electrophoresis revealed the presence of another spot (in addition to the *Atu* proteins) that was specifically expressed in citronellate-grown cells. This spot was identified as the PA1535 gene product by mass spectrometry analysis of peptide fragments generated by trypsin digestion of the isolated spot (data not shown). The PA1535 gene product is also annotated as a potential acyl-CoA dehydrogenase (<http://www.pseudomonas.com>) and has 51% amino acid similarity (34% identity) to *AtuD*. Apparently, two potential acyl-CoA dehydrogenases are specifically expressed in citronellate-grown *P. aeruginosa* cells, namely *AtuD* and the PA1535 gene product.

The importance of *AtuD* and of PA1535 for catabolism of acyclic terpenes was investigated by insertion mutagenesis. The correctness of the insertion in the mutations in *atuD* and PA1535 was verified by appropriate PCR analysis (not shown). Polar downstream effects of the insertion were minimized by positioning the *lac* promoter of pKnockout (constitutively expressed in *P. aeruginosa*) collinear to the genes downstream of the insertion event. Two additional independent insertion mutants in PA1535 were obtained from a *P. aeruginosa* transposon bank (Jacobs *et al.*, 2003). The insertion mutant in *atuD* was unable to utilize any of the tested acyclic terpenes (Table 2) but grew normally on isovalerate, succinate and other unrelated substrates. Interestingly, many small single colonies appeared after 3 days incubation when the *atuD* insertion mutant was streaked on agar plates with citronellol or related compounds (Table 2). Apparently, spontaneous mutation events could suppress the effect of insertion in *atuD*. All mutants in PA1535 grew slightly more slowly on citronellol and citronellate but showed normal growth on geraniol and geranylate. It appears that only *atuD* is essential for acyclic terpene utilization. PA1535 somehow supports growth of *P. aeruginosa* on citronellol but is not essential. A double mutant in both *atuD* and PA1535 showed the same negative phenotype on acyclic terpenes.

The above results suggested that *atuD* and PA1535 could have similar functions in *Atu* pathways. To investigate the enzyme activity of the respective gene products the two genes were cloned in *E. coli* under control of an IPTG-inducible promoter (pET28a). SDS-PAGE analysis of cell extracts of the respective clones after induction revealed the presence of one additional prominent band in each strain that was absent in the control (Fig. 2A). The apparent molecular masses of the additional bands were almost the same (41 \pm 2 kDa) for both proteins investigated and corresponded to the deduced theoretical molecular masses (42.7 kDa and 42.0 kDa for *AtuD* and the PA1535 gene product, respectively). Both proteins were purified to homogeneity (Fig. 2B). The two purified and concentrated proteins were yellow, and spectral analysis confirmed the presence of FAD as cofactor. This result is in agreement

Table 2. Phenotypes of *P. aeruginosa* PAO1 wild-type and mutant strains

Bacteria were incubated at 30 °C for 4 days on solid mineral salts medium with carbon sources as indicated: citronellol (CL), geraniol (GL), citronellate (CA), geranylate (GA), leucine (Leu), isovalerate (IsoV) and succinate (Succ). ++, Good growth; +, growth; ±, poor growth; –, no growth. Asterisks (*) indicate that spontaneous single colonies appeared during incubation after 3 days. Single colonies of the double mutant on citronellol were even smaller than those of the *atuD* single mutant.

Strain	CL	GL	CA	GA	Leu	IsoV	Succ
PAO1	++	+	++	++	+	++	++
PAO1 <i>ins-atuD</i>	–*	–	–*	–	+	++	++
PAO1 <i>ins-PA1535-SK3279</i>	+	+	+	++	+	++	++
PAO1 <i>ins-PA1535-SK3280</i>	+	+	+	++	+	++	++
PAO1 <i>ISlacZ/hah-PA1535-1</i>	+	+	+	++	+	++	++
PAO1 <i>ins-PA1535/ins-atuD-SK3543</i>	–*	–	–*	–	+	++	++
PAO1 <i>ISlacZ/hah-PA1535-2</i>	+	+	+	++	+	++	++

with the finding of putative FAD-binding sites in *AtuD* and the PA1535 protein (see Supplementary Fig. S1, available with the online version of this paper; Dym & Eisenberg, 2001). We determined the specific acyl-CoA dehydrogenase activities and K_m values of both proteins for citronellyl-CoA, 5-methylhex-4-enoyl-CoA, isovaleryl-CoA and octanoyl-CoA (Fig. 3, Table 3). 5-Methylhex-4-enoyl-CoA and isovaleryl-CoA are metabolites of pathways downstream of the *Atu* pathway (β -oxidation and the Liu pathway; see Fig. 1). Octanoyl-CoA was tested as a non-branched compound having the same length of carbon backbone as citronellyl-CoA. As shown in Table 3, citronellyl-CoA dehydrogenase activity of 850 ± 37 mU mg⁻¹ and very high affinity to citronellyl-CoA (K_m 1.6 ± 0.3 μ M) were determined for purified *AtuD*. *AtuD* was inactive with all the other three CoA compounds tested, indicating high substrate specificity. We concluded that *AtuD* has the physiological function of a citronellyl-CoA dehydrogenase. Purified PA1535 protein showed even higher citronellyl-CoA dehydrogenase activity (2450 ± 26 mU mg⁻¹) than *AtuD*

but affinity of the protein to the substrate was more than ten times lower (K_m 18 ± 1.1 μ M). Purified PA1535 protein – in contrast to *AtuD* – exhibited significant octanoyl-CoA activity (610 ± 17 mU mg⁻¹; K_m 130 ± 9.8 μ M) but no activity with isovaleryl-CoA or 5-methylhex-4-enoyl-CoA. This result suggested that PA1535 is a second citronellyl-CoA dehydrogenase but is less specific and has significant activity with unbranched substrates with comparable carbon skeletons.

DISCUSSION

Knowledge about bacterial acyl-CoA dehydrogenases is poor. A few biochemical studies were performed on bacterial short-chain-length acyl-CoA dehydrogenases in the 1970s (Engel & Massey, 1971; Conrad *et al.*, 1974; Massey *et al.*, 1974; reviewed by Massey *et al.*, 1976). In contrast, acyl-CoA dehydrogenases from eukaryotes (mammals, plants), in particular short-chain acyl-CoA dehydrogenases such as

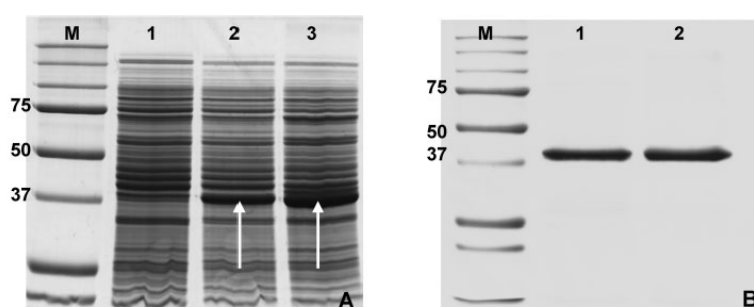


Fig. 2. Expression of acyl-CoA dehydrogenases *AtuD* and PA1535 gene product in recombinant *E. coli*. Soluble cell extracts (50 μ g) of *E. coli* clones were separated by reducing SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. (A) Lane 1, *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS RARE/pET28a; lane 2, *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS RARE/pET28a::*atuD*; lane 3, *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS RARE/pET28a::PA1535. Arrows indicate positions of expressed acyl-CoA dehydrogenases. (B) Lane 1, purified *AtuD*; lane 2, purified PA1535 protein (~7 μ g). Lanes M contain marker proteins (kDa).

K. Förster-Fromme, A. Chattopadhyay and D. Jendrossek

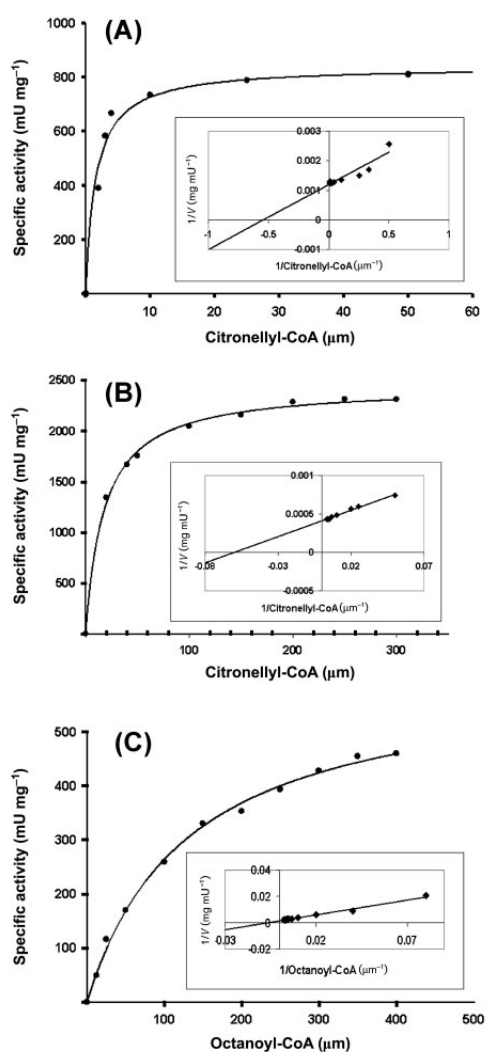


Fig. 3. Determination of V_{max} and K_m values for purified AtuD and PA1535 gene product. Acyl-CoA dehydrogenase activities were determined at different substrate concentrations as described in Methods. The insets show the respective Lineweaver–Burk plot. (A) Citronellyl-CoA dehydrogenase activity of purified AtuD; (B) citronellyl-CoA dehydrogenase activity of purified PA1535 gene product; (C) octanoyl-CoA dehydrogenase activity of purified PA1535 gene product. Representative results from three experiments are shown.

isovaleryl-CoA dehydrogenases, have been investigated in more detail (Däschner *et al.*, 2001; Ikeda & Tanaka, 1983). It is assumed that (eukaryotic) acyl-CoA dehydrogenases with different substrate specificities have evolved from a common ancestral gene (Matsubara *et al.*, 1989). A summary of the

structure and molecular action of catalysis has been published (Djordjevic *et al.*, 1994; Dym & Eisenberg, 2001; Thorpe & Kim, 1995). Biochemical data on acyl-CoA dehydrogenases from bacterial species based on expressed genes and biochemically characterized gene products are scant (Becker *et al.*, 1993). However, genome sequencing in the last decade has revealed numerous potential isovaleryl-CoA and acyl-CoA dehydrogenases from many prokaryotic species. Annotation of the respective genes as acyl-CoA dehydrogenase genes was presumably based on similarity analysis of the gene products to eukaryotic isovaleryl-CoA and acyl-CoA dehydrogenases. However, to our knowledge the biochemical function and the substrate specificities have not been experimentally verified for most putative bacterial acyl-CoA dehydrogenases. Acyl-CoA dehydrogenases with specificity for substrates with terpenoid-carbon skeletons have apparently not been described at all.

Catabolism of acyclic terpenes such as citronellol requires one acyl-CoA dehydrogenase step, namely citronellyl-CoA dehydrogenase, which converts citronellyl-CoA into geranyl-CoA (Fig. 1) (Seubert & Fass, 1964a). The *atuRABCDEF* gene cluster of *P. aeruginosa* harbours one potential acyl-CoA dehydrogenase gene, *atuD*, and purified AtuD showed high specific citronellyl-CoA dehydrogenase activity (850 ± 37 mU mg⁻¹). Because of the low K_m of AtuD for citronellyl-CoA (1.6 μ M) and the inability of AtuD to utilize short- or medium-chain acyl-CoAs such as isovaleryl-CoA or 5-methylhex-4-enoyl-CoA we conclude that AtuD functions as an acyl-CoA dehydrogenase with specificity for a terpenoid carbon backbone molecule *in vivo*. The physiological function of the PA1535 gene product is less obvious. Although PA1535 was specifically expressed in citronellate-grown cells and purified PA1535 gene product had a specific activity with citronellyl-CoA about three times higher than that of AtuD, the K_m of the protein for citronellyl-CoA is 11 times higher than that of AtuD. Moreover, the PA1535 gene product also reacted with unbranched CoA compounds such as octanoyl-CoA, and insertion mutants in PA1535 showed only slightly reduced growth on citronellol and citronellate (Table 2). This indicated that PA1535 is not essential for acyclic terpene utilization and not exclusively specific for substrates with terpenoid structure. Therefore, PA1535 may have other, as yet unidentified, physiological substrates. However, the growth reduction in PA1535 insertion mutants on citronellate and the specific expression of PA1535 gene product in citronellate-grown cells indicated at least a participation of PA1535 in catabolism of acyclic terpenes. A surprising result was the negative phenotype of an *atuD* insertion mutant on acyclic terpenes: if AtuD and the PA1535 gene product have an exchangeable activity (citronellyl-CoA dehydrogenase) one could expect a compensation of the mutation by expression of PA1535. However, the K_m of PA1535 for citronellyl-CoA was about 11 times higher than that of AtuD and the *in vivo* concentration of citronellyl-CoA might be very low. Another reason for the phenotype of *atuD* insertion might be that the activity of the pKnockout-encoded (constitutive)

Table 3. Specific activities of purified acyl-CoA dehydrogenases

Acyl-CoA dehydrogenases were purified as described in Methods and assayed for acyl-CoA dehydrogenase activity with the substrates indicated. The results are means \pm SD ($n = 3$). ND, No significant activity detectable.

	AtuD		PA1535	
	K_M [μ M]	V_{max} (mU mg ⁻¹)	K_M [μ M]	V_{max} (mU mg ⁻¹)
Citronellyl-CoA	1.6 \pm 0.3	850 \pm 37	18 \pm 1.1	2450 \pm 26
Isovaleryl-CoA		ND		ND
Octanoyl-CoA		ND	130 \pm 9.8	610 \pm 17
5-Methylhex-4-enoyl-CoA		ND		ND

lac promoter is relatively low in *P. aeruginosa*: Western blots of *atuD* insertion mutants for biotin proteins indicated constitutive but relatively weak expression of AtuF (biotin subunit of geranyl-CoA carboxylase). Geranyl-CoA carboxylase activity in terpene-grown *P. aeruginosa* wild-type cells is relatively low (Höschle *et al.*, 2005). A combination of reduced citronellyl-CoA dehydrogenase activity with low geranyl-CoA carboxylase expression might result in breakdown of the complete pathway in an *atuD* insertion mutant. A third explanation could be that the inducer compound of PA1535 expression is unknown.

Alignment of the deduced amino acid sequences of AtuD with proteins in the database showed high similarity values only to AtuD of *P. citronellolis* (96%) and to other putative AtuD proteins of *Marinobacter aquaeolei* (91%) and *Hahella chejuensis* (90%). The latter two strains each have a gene cluster similar to the *atu* gene clusters of *P. aeruginosa* and *P. citronellolis* (Förster-Fromme & Jendrossek, 2006) and phytol utilization is documented for *Marinobacter* strains (Holtzapfel & Schmidt-Dannert, 2007). Amino acid alignment to PA1535 and to acyl-CoA dehydrogenases of other species revealed significantly lower degrees of similarity (around 50% similarity for acyl-CoA dehydrogenases and around 35% for isovaleryl-CoA dehydrogenases). Taken together, the biochemical data for purified AtuD and the results of the amino acid alignments show that AtuD is the first biochemically characterized member of a new subgroup of acyl-CoA dehydrogenases with high substrate specificity for terpenoid molecule structure. We predict that more terpene-specific acyl-CoA dehydrogenases will be found in the near future.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a grant of the Deutsche Forschungsgemeinschaft to D.J. We gratefully acknowledge synthesis of 5-methylhex-4-enoic acid by Chris Braddock, London, and analytical support by M. Bott. We also thank Björn Handke for synthesizing 5-methylhex-4-enyl-CoA.

REFERENCES

Aguilar, J. A., Zavala, A. N., Diaz-Perez, C., Cervantes, C., Diaz-Perez, A. L. & Campos-Garcia, J. (2006). The *atu* and *liu* clusters are

involved in the catabolic pathways for acyclic monoterpenes and leucine in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* **72**, 2070–2079.

Becker, D. F., Fuchs, J. A., Banfield, D. K., Funk, W. D., MacGillivray, R. T. & Stankovich, M. T. (1993). Characterization of wild-type and an active-site mutant in *Escherichia coli* of short-chain acyl-CoA dehydrogenase from *Megasphaera elsdenii*. *Biochemistry* **32**, 10736–10742.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248–254.

Cantwell, S. G., Lau, E. P., Watt, D. S. & Fall, R. R. (1978). Biodegradation of acyclic isoprenoids by *Pseudomonas* species. *J Bacteriol* **135**, 324–333.

Conrad, R. S., Massey, L. K. & Sokatch, J. R. (1974). D- and L-isoleucine metabolism and regulation of their pathways in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* **118**, 103–111.

Däschner, K., Couee, I. & Binder, S. (2001). The mitochondrial isovaleryl-coenzyme A dehydrogenase of *Arabidopsis* oxidizes intermediates of leucine and valine catabolism. *Plant Physiol* **126**, 601–612.

Djordjevic, S., Dong, Y., Paschke, R., Frerman, F. E., Strauss, A. W. & Kim, J. J. (1994). Identification of the catalytic base in long chain acyl-CoA dehydrogenase. *Biochemistry* **33**, 4258–4264.

Dym, O. & Eisenberg, D. (2001). Sequence-structure analysis of FAD-containing proteins. *Protein Sci* **10**, 1712–1728.

Engel, P. C. (1981). Butyryl-CoA dehydrogenase from *Megasphaera elsdenii*. *Methods Enzymol* **71**, 495–508.

Engel, P. C. & Massey, V. (1971). The purification and properties of butyryl-coenzyme A dehydrogenase from *Peptostreptococcus elsdenii*. *Biochem J* **125**, 879–887.

Förster-Fromme, K. & Jendrossek, D. (2006). Identification and characterization of the acyclic terpene utilization gene cluster of *Pseudomonas citronellolis*. *FEMS Microbiol Lett* **264**, 220–225.

Förster-Fromme, K., Höschle, B., Mack, C., Bott, M., Armbruster, W. & Jendrossek, D. (2006). Identification of genes and proteins necessary for catabolism of acyclic terpenes and leucine/isovalerate in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* **72**, 4819–4828.

Harder, J. & Probian, C. (1995). Microbial degradation of monoterpenes in the absence of molecular oxygen. *Appl Environ Microbiol* **61**, 3804–3808.

Heyen, U. & Harder, J. (2000). Geranic acid formation, an initial reaction of anaerobic monoterpene metabolism in denitrifying *Alcaligenes defragrans*. *Appl Environ Microbiol* **66**, 3004–3009.

Hierro, I., Valero, A., Perez, P., Gonzalez, P., Cabo, M. M., Montilla, M. P. & Navarro, M. C. (2004). Action of different monoterpene compounds against *Anisakis simplex* s.l. L3 larvae. *Phytomedicine* **11**, 77–82.

K. Förster-Fromme, A. Chattopadhyay and D. Jendrossek

- Holtzapfle, E. & Schmidt-Dannert, C. (2007). Biosynthesis of isoprenoid wax ester in *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* DSM 8798: identification and characterization of isoprenoid coenzyme A synthetase and wax ester synthases. *J Bacteriol* **189**, 3804–3812.
- Höschle, B. & Jendrossek, D. (2005). Utilization of geraniol is dependent on molybdenum in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for different metabolic routes for oxidation of geraniol and citronellol. *Microbiology* **151**, 2277–2283.
- Höschle, B., Gnau, V. & Jendrossek, D. (2005). Methylcrotonyl-CoA carboxylase and geranyl-CoA carboxylase are involved in leucine/isovalerate utilisation (Liu) and in acyclic terpenes utilisation (Atu) and are encoded by *liuB/liuD* and *atuC/atuF* in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **151**, 3649–3656.
- Hylemon, P. B. & Harder, J. (1998). Biotransformation of mono-terpenes, bile acids, and other isoprenoids in anaerobic ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* **22**, 475–488.
- Ikeda, Y. & Tanaka, K. (1983). Purification and characterization of isovaleryl coenzyme A dehydrogenase from rat liver mitochondria. *J Biol Chem* **258**, 1077–1085.
- Jacobs, M. A., Alwood, A., Thaipisuttikul, I., Spencer, D., Haugen, E., Ernst, S., Will, O., Kaul, R., Raymond, C. & other authors (2003). Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 14339–14344.
- Massey, L. K., Conrad, R. S. & Sokatch, J. R. (1974). Regulation of leucine catabolism in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* **118**, 112–120.
- Massey, L. K., Sokatch, J. R. & Conrad, R. S. (1976). Branched-chain amino acid catabolism in bacteria. *Bacteriol Rev* **40**, 42–54.
- Matsubara, Y., Indo, Y., Naito, E., Ozasa, H., Glassberg, R., Vockley, J., Ikeda, Y., Kraus, J. & Tanaka, K. (1989). Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNAs encoding the precursors of rat long chain acyl-coenzyme A, short chain acyl-coenzyme A, and isovaleryl-coenzyme A dehydrogenases. Sequence homology of four enzymes of the acyl-CoA dehydrogenase family. *J Biol Chem* **264**, 16321–16331.
- Prakash, O., Kumari, K. & Lal, R. (2007). *Pseudomonas delhiensis* sp. nov., from a fly ash dumping site of a thermal power plant. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 527–531.
- Schlegel, H. G., Kaltwasser, H. & Gottschalk, G. (1961). A submersion method for culture of hydrogen-oxidizing bacteria: growth physiological studies. *Arch Mikrobiol* **38**, 209–222.
- Seubert, W. (1960). Degradation of isoprenoid compounds by microorganisms. I. Isolation and characterization of an isoprenoid-degrading bacterium, *Pseudomonas citronellois* n. sp. *J Bacteriol* **79**, 426–434.
- Seubert, W. & Fass, E. (1964a). Studies on the bacterial degradation of isoprenoids. V. The mechanism of isoprenoid degradation. *Biochem Z* **341**, 35–44.
- Seubert, W. & Fass, E. (1964b). Studies on the bacterial degradation of isoprenoids. IV. The purification and properties of β -isohexenylglutaconyl-CoA-hydratase and β -hydroxy- β -isohexenylglutaryl-CoA-lyase. *Biochem Z* **341**, 23–34.
- Seubert, W. & Remberger, U. (1963). Studies on the bacterial degradation of isoprenoids. II. The role of carbon dioxide. *Biochem Z* **338**, 245–264.
- Seubert, W., Fass, E. & Remberger, U. (1963). Studies on the bacterial degradation of isoprenoids. III. Purification and properties of geranyl carboxylase. *Biochem Z* **338**, 265–275.
- Thorpe, C. & Kim, J. J. (1995). Structure and mechanism of action of the acyl-CoA dehydrogenases. *FASEB J* **9**, 718–725.
- Windgassen, M., Urban, A. & Jaeger, K. E. (2000). Rapid gene inactivation in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* **193**, 201–205.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103–119.

Edited by: W. H. Schwarz

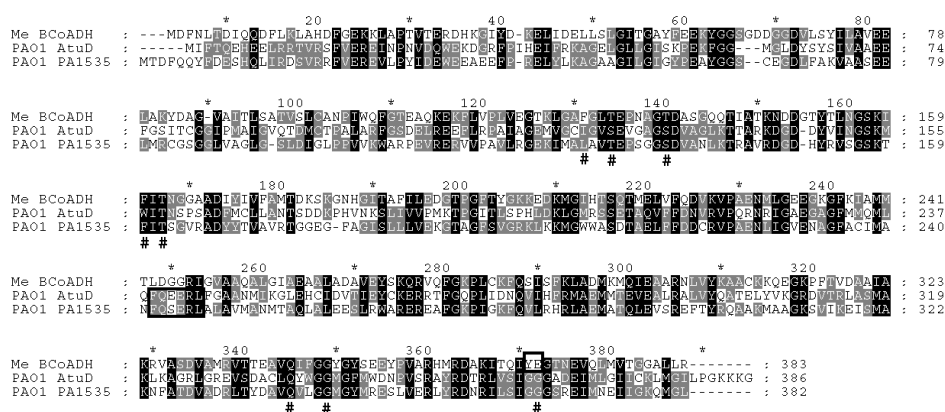


Fig. S1. Förster-Fromme *et al.*
Microbiology (2008), 154, 789-976

Fig. S1. Multiple sequence alignment of AtuD, the PA1535 gene product and *Megasphaera elsdenii* butyryl-CoA dehydrogenase. CLUSTALX was used for alignment. Identical and similar amino acids are shaded in black and grey, respectively. Conserved sequences around putative FAD-binding sites and active sites (Djordjevic *et al.*, 1994; Dym & Eisenberg, 2001) are boxed and marked by #, respectively.

Anhang 5

Tab. 1: Spezifische NAD⁺-abhängige Alkohol-/Aldehyd-Dehydrogenase-Aktivitäten in *P. aeruginosa* PAO1 WT Rohextrakten von mit verschiedenen C-Quellen gewachsenen Zellen

		Spezifische Aktivitäten in [mU/mg] in löslichen <i>P. aeruginosa</i> PAO1 Rohextrakten von mit ... als C-Quelle gewachsenen Zellen		
Enzym-substrat ▼	C-Quelle ►	Citronellol	Geraniol	Glucose
Citronellol		0,25	0,87	nn
Geraniol		3	3,7	3,6
Citronellal		13	7,7	2,4
Geranial		1,7	1,2	0,65

Legende: nn: Aktivität nicht nachweisbar

Tab. 2: Spezifische NADP⁺-abhängige Alkohol-/Aldehyd-Dehydrogenase-Aktivitäten in *P. aeruginosa* PAO1 WT Rohextrakten von mit verschiedenen C-Quellen gewachsenen Zellen

		Spezifische Aktivitäten in [mU/mg] in löslichen <i>P. aeruginosa</i> PAO1 Rohextrakten von mit ... als C-Quelle gewachsenen Zellen		
Enzym-substrat ▼	C-Quelle ►	Citronellol	Geraniol	Glucose
Citronellol		1,2	1,6	nn
Geraniol		1,9	4	nn
Citronellal		1,3	nn	nn
Geranial		nn	nn	nn

Legende: nn: Aktivität nicht nachweisbar

Tab. 3: Spezifische Quinon-abhängige Alkohol-/Aldehyd-Dehydrogenase-Aktivitäten in *P. aeruginosa* PAO1 WT Rohextrakten von mit verschiedenen C-Quellen gewachsenen Zellen

		Spezifische Aktivitäten in [mU/mg] in löslichen <i>P. aeruginosa</i> PAO1 Rohextrakten von mit ... als C-Quelle gewachsenen Zellen		
Enzym-substrat ▼	C-Quelle ►	Citronellol	Geraniol	Glucose
Citronellol		nn	nn	nn
Geraniol		48	69	12
Citronellal		70	94	18
Geranial		104	138	24

Legende: nn: Aktivität nicht nachweisbar

Tab. 4: Spezifische Quinon-abhängige Alkohol-/Aldehyd-Dehydrogenase-Aktivitäten in *P. aeruginosa* PAO1 ins-PA1982 Rohextrakten von mit verschiedenen C-Quellen gewachsenen Zellen

		Spezifische Aktivitäten in [mU/mg] in löslichen <i>P. aeruginosa</i> PAO1 Rohextrakten von mit ... als C-Quelle gewachsenen Zellen		
Enzym-substrat ▼	C-Quelle ►	Citronellol	Geraniol	Isovaleriansäure
Citronellol		nn	nn	nn
Geraniol		171	35	94
Citronellal		225	57	155
Geranial		259	44	153

Legende: nn: Aktivität nicht nachweisbar

Danksagungen

Bei Herrn Prof. Dr. D. Jendrossek bedanke ich mich für die Überlassung des Themas, für sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit, seine ständige Diskussionsbereitschaft und die gute Betreuung. Dies alles hat maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Bei Herrn Prof. Dr. A. Heyer bedanke ich mich für die Übernahme des Korreferates.

Bei Herrn Prof. Dr. G. Sprenger bedanke ich mich für die Möglichkeit, die experimentellen Arbeiten zu dieser Arbeit an seinem Institut anfertigen zu können.

Frau Dr. Anne Samland danke ich für die Einführung in die Methodik der 2D-Gelelektrophorese.

Sarah Schneider danke ich für eine Einführung in die Methodik der Gelfiltration und für das Sonnenlicht.

Bei Dr. W. Armbruster (Universität Hohenheim, HPLC-MS), Prof. Dr. M. Bott und Frau C. Mack (Forschungszentrum Jülich, Maldi-ToF) bedanke ich mich für Meßzeiten.

Des weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie für die nette Arbeitsatmosphäre und die stetige Hilfsbereitschaft bedanken. Insbesondere danke ich Birgit Höschle und Nadine Randel für die gute Zusammenarbeit.

Björn Handke und Ava Chattopadhyay danke ich für ihre sehr gute Mitarbeit am Citronellol-Projekt.

Meinen Eltern und Bernhard danke ich von ganzem Herzen für ihre stete Unterstützung.

Bei Thomas bedanke ich mich einfach für alles.

Lebenslauf

Karin Förster-Fromme

Geboren am 9. Februar 1973 in Ludwigsburg

09/1983 - 07/1990	Ellental-Gymnasium, Bietigheim-Bissingen
08/1990 - 07/1993	Berufsausbildung zur Elektromechanikerin bei der Bürkle & Schöck Transformatorenbau GmbH
08/1993 - 06/1995	Technische Oberschule Stuttgart
06/1995	Fachgebundene Hochschulreife
10/1996 - 05/2004	Studium der Technischen Biologie (Diplom) an der Universität Stuttgart
04/2003 - 05/2004	Diplomarbeit bei Prof. Dr. D. Jendrossek, Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart Thema: „Molekularbiologische und biochemische Charakterisierung von Mutanten des Citronellolstoffwechsels in <i>Pseudomonas citronellolis</i> “
05/2004	Diplom Technische Biologie
07/2004	Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Arbeit bei Prof. Dr. D. Jendrossek am Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart