

**Identifizierung zweier Gencluster
(*atuABCDEFGH*, *liuRABCDE*)
in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1
und deren funktionelle Analyse im Metabolismus
methylverzweigter Verbindungen**

Von der Fakultät für Geo- und Biowissenschaften
der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Abhandlung

vorgelegt von
Birgit Höschle
aus Backnang

Hauptberichter: Prof. Dr. D. Jendrossek

Mitberichter: Prof. Dr. G. Sprenger

Tag der mündlichen Prüfung: 23. März 2006

Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart
2006

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

Abkürzungen	4
Abstract	5
Kurzfassung.....	7
1 Einleitung.....	9
1.1 Vorkommen von Terpenen.....	9
1.2 Abbau von azyklischen Terpenen	10
1.3 Ziele dieser Arbeit	17
2 Identifizierung der Gene des Citronellolabbaus in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	18
2.1 Identifizierung direkt und indirekt beteiligter Gene am Citronellolstoffwechsel.....	18
2.2 Molybdänabhängige Oxidation von Geraniol zur Geranylsäure	22
2.3 Das <i>atu</i> -Cluster für den Abbau von azyklischen Terpenen	28
2.4 Das <i>liu</i> -Cluster für den Abbau von Leucin und Isovaleriansäure.....	36
2.5 Klonierung des <i>atu</i> -Clusters aus <i>P. aeruginosa</i> PAO1	44
3 Literatur	52
Appendix 1: Utilization of geraniol is depend on molybdenum in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : evidence for different metabolic routes for oxidation of geraniol and citronellol	57
Appendix 2: Methylcrotonyl-CoA and geranyl-CoA carboxylases are involved in leucine/isovalerate utilization (Liu) and acyclic terpene utilization (Atu), and are encoded by <i>liuB/liuD</i> and <i>atuC/atuF</i> , in <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	64
Appendix 3: The <i>Pseudomonas aeruginosa</i> gene clusters <i>atuABCDEFGH</i> and <i>liuRABCDE</i> encode proteins of the acyclic terpene utilisation pathway (Atu) and of the leucine/isovalerate utilisation (Liu) pathway, respectively.....	72
Danksagungen	96
Lebenslauf.....	97

Abkürzungen

Atu	acyclic (mono-)terpene utilization
bp	Basenpaare
CoA	Coenzym A
C	Citronellol
CS	Citronellsäure
G	Geraniol
GCase	Geranyl-CoA-Carboxylase
GS	Geranylsäure
HPLC	High performance liquid chromatography
HPLC-MS	High performance liquid chromatography, gekoppelt mit Massenspektrometrie
kbp	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton
Liu	Leucine/Isovalerate utilization
MCase	Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase
MGD	Molybdopterin-Guanin-Dinucleotid
Moco	Molybdäncofaktor
MPT	Molybdopterin
MW	Molekulargewicht
ORF	open reading frame
t_d	Verdopplungszeit
U	Einheiten

Abstract

Acyclic terpenes like citronellol and geraniol are widespread odours in nature which are difficult to metabolize for microorganisms due to their β -methyl branched structures. Degradation of acyclic terpenes by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 was investigated in the present work.

1. Two gene clusters were identified by insertion mutagenesis, which code for the most degradation steps postulated in earlier biochemical studies. The first gene cluster is composed of eight genes and one potential regulator gene and corresponds to the gene products of ORF PA2885 to PA2893 of the *P. aeruginosa* PAO1 database. The second gene cluster (*gny*-cluster), which was independently identified by Diaz-Perez and coworkers [DIAZ-PEREZ et al. (2004), Appl Environ Microbiol 70: 5102] and by me, contains five genes and a probable regulator gene and corresponds to the gene products of ORF PA2016 to PA2011.
2. Insertions in the first gene cluster (PA2890 and PA2891) resulted in loss of ability to utilize and to grow on acyclic terpenes while growth on leucine and isovalerate was not affected in the respective mutants. Insertions in the second gene cluster (PA2012 and PA2013) resulted in loss of growth on both acyclic terpenes (citronellol, geraniol) and on leucine and isovalerate. The first gene cluster was named as *atu*- (acylic terpene utilization) cluster, the *gny*-cluster was renamed *liu*- (leucline/isovalerate utilization) cluster.
3. The degradation pathway of citronellol contains two characteristic carboxylation steps (geranyl-CoA carboxylase [GCCase] and methylcrotonyl-CoA carboxylase [MCCase]). These carboxylation steps convert the β -methyl branched group of geranyl-CoA and methylcrotonyl-CoA to acetate side chains which are cleaved off in subsequent enzymatic steps. Both carboxylases were purified from crude extracts by avidin-affinity chromatography and were unequivocally identified as gene products of PA2888/PA2891 (*atuD/atuF*; GCCase) and gene products of PA2014/PA2012 (*liuB/liuD*; MCCase) by trypsin-fingerprint-mass spectrometry, respectively. Activity determinations of GCCase and MCCase as well as Western blot analysis

confirmed that GCase was only induced by growth on citronellol. MCase was induced by growth on citronellol as well as on leucine and isovalerate, respectively.

4. Plausible biochemical functions of the other gene products from the *atu*- and *liu*- gene clusters were predicted by database analysis.
5. Predicted gene products with high similarity to gene products of the *liu*-cluster were found in different pseudomonads (*P. putida* KT2440, *P. fluorescens* Pf-5, *P. syringae tomato* DC3000). Predicted proteins with high similarity to the *atu*-cluster were only found in *P. fluorescens* PF-5. The latter is the only strain of these pseudomonads able to use citronellol as sole source of carbon and energy.
6. The *atu*-cluster of *P. aeruginosa* PAO1 was transferred to *P. putida* KT2440, *P. fluorescens* Pf-5 and *P. syringae tomato* DC3000. None of the recombinant strains was able to use citronellol and geraniol as carbon source. Thus, it is likely that so far other unknown genes are needed for a functional degradation pathway.
7. Investigations of additional transposon mutants of *P. aeruginosa* and inhibition tests with tungstate revealed that oxidation of geraniol but not of citronellol requires molybdenum-dependent steps and is therefore different to the oxidation of citronellol. This conclusion is in agreement with the finding that the *moeA2* gene (PA3028), which is involved in molybdenum cofactor biosynthesis, is essential for geraniol degradation.

Kurzfassung

Azyklische Terpene wie Citronellol und Geraniol sind in der Natur weit verbreitete Geruchsstoffe, die aufgrund ihrer β -methylverzweigten Struktur von Mikroorganismen nur schwer metabolisiert werden können. In der vorliegenden Arbeit wurde der Abbau azyklischer Terpene in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 untersucht.

1. Durch Insertionsmutagenesen wurden zwei Gencluster identifiziert, die für die meisten der in früheren biochemischen Beiträgen postulierten Abbauschritte codieren. Das erste Gencluster besteht aus acht Genen und einem potentiellen Regulatorgen und entspricht den Genprodukten der ORF PA2885 bis PA2993 der *P. aeruginosa* PAO1 Datenbank. Das zweite Gencluster (*gny*-Cluster), welches durch Diaz-Perez und Mitarbeiter identifiziert wurde [DIAZ-PEREZ et al. (2004), Appl Environ Microbiol 70: 5102] besteht aus fünf Genen und einem vermeintlichen Regulatorgen und entspricht den Genprodukten der ORF PA2016 bis PA2011.
2. Insertionen im ersten Gencluster (PA2890 und PA2891) führten zu einem Verlust des Wachstums auf azyklischen Terpenen, die Fähigkeit zum Wachstum auf Leucin und Isovaleriansäure war nicht beeinträchtigt. Insertionen im zweiten Gencluster (PA2012 und PA2013) führten hingegen zum Verlust des Wachstums sowohl auf azyklischen Terpenen (Citronellol, Geraniol) als auch auf Leucin und Isovaleriansäure. Das erste Gencluster wurde als *atu*- (acyclic terpene utilization) Gencluster bezeichnet, das *gny*-Cluster wurde in das *liu*- (leucine/isovalerate utilization) Gencluster umbenannt.
3. Der aus biochemischen Untersuchungen postulierte Abbauweg von Citronellol enthält zwei charakteristische Carboxylierungsschritte (Geranyl-CoA-Carboxylase [GCCase] und Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase [MCCase]). Diese wandeln die β -Methylverzweigungen in Acetatseitengruppen um, welche in anschließenden enzymatischen Reaktionen abgespalten werden. Beide Carboxylasen wurden durch Avidin-Affinitätschromatographie aus Zellextrakten gereinigt und durch Trypsin-Fingerprint-Massenspektrometrie als Genprodukte von PA2888/PA2891 (*atuD/atuF*; GCCase) bzw. als Genprodukte von PA2014/PA2012 (*liuB/liuD*;

MCase) eindeutig identifiziert. Durch Western-Blot Analysen und Aktivitätsbestimmungen der GCase und MCase wurde bestätigt, dass die GCase (AtuF) nur beim Wachstum auf Citronellol, die MCase (LiuD) sowohl beim Wachstum auf Citronellol als auch beim Wachstum auf Leucin bzw. Isovaleriansäure induziert wurde.

4. Für die übrigen Genprodukte des *atu*- und *liu*-Genclusters konnten die möglichen biochemischen Funktionen durch Datenbankvergleiche vorhergesagt werden.
5. Vorausgesagte Genprodukte mit hohen Ähnlichkeiten zu den Genprodukten des *liu*-Clusters konnten in anderen Pseudomonaden (*P. putida* KT2440, *P. fluorescens* Pf-5, *P. syringae tomato* DC3000) nachgewiesen werden. Vorausgesagte Proteine mit hohen Ähnlichkeiten zu den Genprodukten des *atu*-Clusters konnten nur in *P. fluorescens* Pf-5 festgestellt werden, der als einziger dieser Pseudomonaden in der Lage ist, Citronellol als Kohlenstoffquelle zu verwerten.
6. Das *atu*-Cluster aus *P. aeruginosa* PAO1 konnte in die Pseudomonaden *P. putida*, *P. fluorescens* GK13 und *P. oleovorans* übertragen werden. Keiner dieser rekombinanten Stämme war anschließend in der Lage, Citronellol und Geraniol als Kohlenstoffquelle zu verwerten, so dass offenbar noch weitere, bislang unbekannte Gene für einen funktionellen Abbauweg notwendig sind.
7. Die Untersuchungen von weiteren Transposoninsertionsmutanten und Hemmversuche mit Wolframat ergaben, dass die Oxidation von Geraniol über molybdänabhängige Schritte verläuft, und somit unterschiedlich zur Oxidation von Citronellol ist. Weiterhin zeigte sich, dass das *moeA2*-Gen (ORF PA3028), welches an der Molybdäncofaktor-Biosynthese beteiligt ist, für die Verwertung von Geraniol essentiell ist.

1 Einleitung

1.1 Vorkommen von Terpenen

Terpene sind in der Natur weit verbreitete Stoffe. Sie bilden eine Untergruppe der Terpenoide, der in der Natur vorkommenden Methyl-verzweigten Verbindungen. Alle Terpenoide sind aus Isopreneinheiten (C_5) aufgebaut und kommen als Kohlenwasserstoff-, Alkohol-, Glycosid-, Ether-, Aldehyd-, Keton-, Carbonsäure- oder Esterverbindungen vor. Man unterteilt sie nach der Anzahl der verwendeten Isopreneinheiten in verschiedene Klassen. (Mono-)Terpene, die aus zwei Isopreneinheiten durch Kopf-Schwanz-Addition aufgebaut sind, sind zusammen mit den Sesquiterpenen ($3 \times C_5$) Hauptbestandteil von ätherischen Ölen, die von Pflanzen als Sekundärstoffe gebildet werden (KULL, 1993; Quelle im Internet: <http://de.wikipedia.org/wiki/Terpene>). Zu den wichtigsten azyklischen Terpenalkoholen gehören Citronellol, Geraniol und Nerol, zu den azyklischen Terpen-carbonsäuren die Geraniumsäure (Geranylsäure). Bekannte Vertreter der monozyklischen Terpene sind Menthol und Limonen, solche der bicyklischen Terpene Campher. Zu der großen Gruppe der Terpenoide gehören auch die Steroide (C_{30}), die Carotinoide (C_{40}) und Polyisopren (Naturkautschuk) (KULL, 1993). In Bild 1.1 sind wichtige Vertreter der Terpenoide dargestellt.

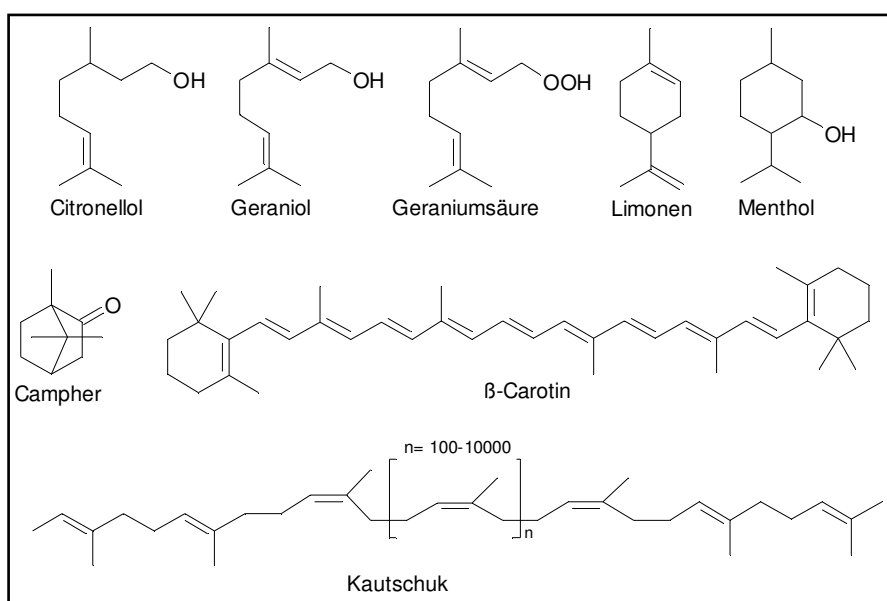


Bild 1.1: Wichtige Vertreter von Terpenoiden.

Citronellol (3,7-Dimethyl-6-octen-1-ol) ist eine Modellverbindung für lineare Terpene, die in der Natur in allen Citruspflanzen vorkommt, wo es für das charakteristische Aroma der Früchte verantwortlich ist. Durch diese Eigenschaft besteht ein kommerzielles Interesse an Citronellol und es wird in der Lebensmittelindustrie als Geschmackstoff und in der Parfum- und Kosmetikindustrie als Duftstoff eingesetzt. Auch zählen Citronellol bzw. Citronellal zu den wenigen natürlich vorkommenden Insekten-/Moskito-Abwehrmittel (HIERRO et al., 2004; PAWAR et al., 1991; RICE & COATS, 1994) und sind somit Zusatz von vielen kommerziell erhältlichen Insektenabwehrkerzen (Citronella-Kerzen). Durch ihre larvicide und ovicide Wirkung können diese Stoffe auch als natürliche Insektenvernichtungsmittel eingesetzt werden. Geraniol unterscheidet sich von Citronellol nur durch eine zusätzliche Doppelbindung (Bild 1.1). Dieser Alkohol ist verantwortlich für den typischen Geruch von Pflanzen, die zur Gattung *Geranium* und *Pelargonium* gehören (KULL, 1993). In neuester Zeit konnte gezeigt werden, dass Geraniol und ähnliche Komponenten starke Effekte auf eukaryontische Zellen ausüben und einen apoptoseähnlichen Zelltod auslösen können (IZUMI et al., 1999). So konnte gezeigt werden, dass Geraniol das Wachstum von Pankreaskrebs inhibiert und die Apoptose in Pankreaskrebszellen erhöht (BURKE et al., 1997; BURKE et al., 2002). Ebenso konnte gezeigt werden, dass durch die Interaktion von Geraniol mit der Zellmembran (CARNESECCHI et al., 2002a) der Prozess der Zelldifferenzierung verhindert und die Aufnahme von chemotherapeutisch wirksamen Agenzien in die Krebszellen erleichtert wird (CARNESECCHI et al., 2002b; CARNESECCHI et al., 2004; DUNCAN et al., 2004).

Während die Biosynthese von Terpenoiden bereits sehr gut erforscht ist, ist über den Abbau dieser Stoffe in Mikroorganismen bisher nur sehr wenig bekannt.

1.2 Abbau von azyklischen Terpenen

Der Abbau von azyklischen Terpenen wie Citronellol und Geraniol konnte erstmals Anfang der 60iger Jahre nach der Isolierung von *Pseudomonas citronellolis* (SEUBERT, 1960) durch W. Seubert und Mitarbeiter untersucht werden (SEUBERT et al., 1963; SEUBERT & FASS, 1964a; SEUBERT & FASS, 1964b; SEUBERT & REMBERGER, 1963). Durch Isolierung verschiedener Zwischenprodukte und

Aufreinigung von Enzymen war daraufhin ein Abbauweg vorgeschlagen worden (SEUBERT & FASS, 1964b). Durch das Vorhandensein β -ständiger Methylgruppen, die einen Abbau durch β -Oxidation verhindern, ist der Abbau von linearen Terpenen erschwert und im Reich der Mikroorganismen nicht weit verbreitet. So konnte der Abbau azyklischer Monoterpene nur in *Pseudomonas citronellolis*, *Pseudomonas mendocina* und *Pseudomonas aeruginosa* (CANTWELL et al., 1978; SCHAEFFER et al., 1979) nachgewiesen werden.

Der von Seubert und Fass vorgeschlagene Abbauweg für Citronellol und Geraniol in *P. citronellolis* ist in Bild 1.2 dargestellt. In den ersten Schritten des Abbaus von Citronellol und Geraniol werden die Alkohole zu den zugehörigen Aldehyden (Citronellal und Geranial (Citral)) und weiter zu den Säuren (Citronellsäure und Geranylsäure) oxidiert (SEUBERT & REMBERGER, 1963). Durch die hohe Ähnlichkeit von Citronellol und Geraniol (Unterschied in einer Doppelbindung) wird angenommen, dass die Oxidation der Alkohole zu den Aldehyden und die weitere Oxidation zu den Säuren durch jeweils dieselben Enzyme katalysiert werden (CANTWELL et al., 1978). Im Anschluss erfolgt eine Aktivierung der Säuren durch eine Synthetase mit Coenzym A zu Thioestern. Die Umwandlung von Citronellyl-CoA zu *cis*-Geranyl-CoA erfolgt über eine Dehydrogenase. Auf der Stufe von *cis*-Geranyl-CoA vereinigt sich der Abbau von Citronellol und Geraniol. Der folgende Schritt im Reaktionsweg wird durch ein Schlüsselenzym des Abbauweges katalysiert. Das für den Abbauweg charakteristische Enzym ist die biotinabhängige Geranyl-CoA-Carboxylase (GCase) (SEUBERT et al., 1963), die die Carboxylierung der β -Methylgruppe zu einer Acetatgruppe katalysiert (SEUBERT & REMBERGER, 1963). Das so entstandene Isohexenylglutaconyl-CoA wird durch die Isohexenylglutaconyl-CoA-Hydratase (SEUBERT & FASS, 1964a) zu 3-Hydroxy-3-isohexenylglutaryl-CoA hydratisiert. Mit Hilfe der 3-Hydroxy-3-isohexenylglutaryl-CoA:Acetat-Lyase (SEUBERT & FASS, 1964a) wird nun die durch die Geranyl-CoA-Carboxylase gebildete Acetatseitengruppe als freie Essigsäure (SEUBERT & REMBERGER, 1963) abgespalten und es entsteht 7-Methyl-3-oxo-6-octenoyl-CoA, eine teilweise unverzweigte Kohlenstoffkette, die durch β -Oxidation um weitere zwei Acetyl-CoA-Moleküle verkürzt werden kann. Das entstandene, um eine Isopreneinheit verkürzte 3-Methylcrotonyl-CoA, wird über den Leucinabbauweg metabolisiert, der sehr ähnlich abläuft. Auch hier erfolgt die Carboxylierung der

β -ständigen Methylgruppe zu einer Acetatseitengruppe mit Hilfe der ebenfalls biotinabhängigen 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase (MCCase). Diese Carboxylase besitzt eine hohe Spezifität gegenüber ihrem Substrat 3-Methylcrotonyl-CoA und ist nicht in der Lage, Geranyl-CoA als Substrat umzusetzen (HECTOR & FALL, 1976b; SEUBERT & FASS, 1964b). Die Doppelbindung des entstandenen 3-Methylglutaconyl-CoA wird durch die Methylglutaconyl-CoA-Hydratase zu 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA hydratisiert, welches dann durch die Hydroxymethylglutaryl-CoA-Lyase zu Acetyl-CoA und Acetoacetat gespalten wird, die im Stoffwechsel weiter umgesetzt werden können.

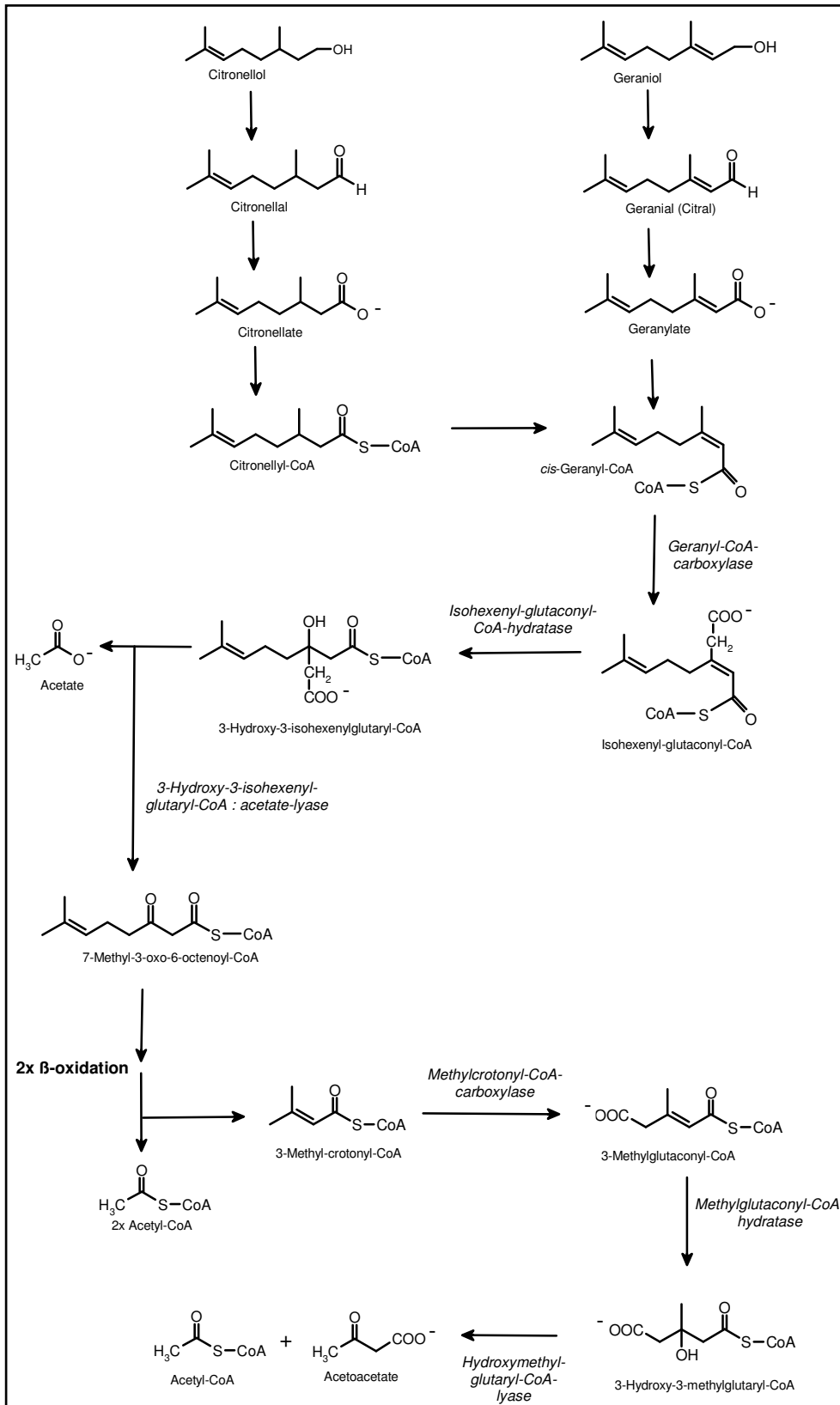


Bild 1.2: Abbau von Citronellol und Geraniol in *P. citronellolis* nach SEUBERT & FASS (1964b) aus HÖSCHLE & JENDROSSEK (2005)

Diese Ergebnisse wurden von den weiteren Untersuchungen, die von M. Fall und Mitarbeitern in den 70iger Jahren durchgeführt wurden (FALL et al., 1979; FALL, 1981; FALL & HECTOR, 1977), gestützt. Der Schwerpunkt dieser Arbeiten lag in der biochemischen Charakterisierung der beiden im Abbauweg vorkommenden Carboxylasen (GCase und MCase). So konnte gezeigt werden, dass die Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase (MCase) beim Wachstum auf Isovaleriansäure bzw. Leucin induziert wird, beim Wachstum auf Citronellsäure bzw. Geranylsäure sowohl die Geranyl-CoA-Carboxylase (GCase) als auch die Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase (MCase) induziert werden (HECTOR & FALL, 1976b). Durch die Aufreinigung der beiden Enzyme aus *P. citronellolis* und Markierung der Carboxylasen mit radioaktivem Biotin konnten die Eigenschaften genauer untersucht werden. So bestehen beide Carboxylasen aus einer kleineren, biotinfreien Untereinheit und aus einer größeren, biotinhaltigen Untereinheit (FALL & HECTOR, 1977). Sowohl die biotinfreie Untereinheit der GCase als auch der MCase zeigten im Western Blot eine Größe von 63 kDa. Die Größe der biotinhaltigen Untereinheit der GCase wurde mit 75 kDa, die biotinhaltige Untereinheit der MCase mit 73 kDa identifiziert (FALL & HECTOR, 1977). Weiterhin konnte anhand des Biotingehalts und der Größe des nativen Proteins geschlossen werden, dass beide Carboxylasen als tetramere Struktur vorliegen müssen (A_4B_4). Bei der Untersuchung der Substratspektren der beiden Carboxylasen konnte gezeigt werden, dass die gereinigte MCase eine sehr hohe Spezifität gegenüber ihrem Substrat 3-Methylcrotonyl-CoA aufweist aber nicht in der Lage ist, Geranyl-CoA umzusetzen. Die gereinigte GCase kann Acyl-CoA-Substrate mit einer Länge von 5 bis 15 Kohlenstoffatomen, wie 3-Methylcrotonyl-CoA, *cis*-Geranyl-CoA und Farnesyl-CoA umsetzen. Jedoch kann die GCase nur Geranyl-CoA in *cis*-Konfiguration und nicht in *trans*-Konfiguration als Substrat verwenden (FALL, 1981).

Neue Untersuchungen zum Abbau von azyklischen Terpenen in *P. citronellolis* zeigten, dass eine Malat:Quinonoxidoreduktase (MqoB) als Teil des Glyoxylatzyklus für das Wachstum auf Acetat und somit auch für das Wachstum auf azyklischen Terpenen notwendig ist (FÖRSTER-FROMME & JENDROSSEK, 2005). Es konnten zwei Transposonmutanten isoliert werden, die kein Wachstum auf Citronellole, Geraniol, Citronellsäure, Geranylsäure und Acetat zeigten. Die Transposoninsertionsorte konnten innerhalb bzw. in der Promotorregion eines Gens

mit hoher Ähnlichkeit zur Malat:Quinonoxidoreduktase (MqoB) aus *Pseudomonas aeruginosa* und anderen Pseudomonaden nachgewiesen werden. Durch Expression eines intakten *mgoB*-Gens in den Mutanten konnte der Phänotyp des Wildtyps wiederhergestellt werden. Auch *mgoB*-Mutanten von *P. aeruginosa* zeigten kein Wachstum auf azyklischen Terpenen. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass die Malat:Quinonoxidoreduktase für das Wachstums auf Acetat notwendig ist, da Acetat über den Glyoxylatzyklus in den Stoffwechsel eingeschleust wird und MqoB für den Glyoxylatzyklus essentiell ist. Damit konnte gezeigt werden, dass lineare Terpene wie Citronellol, Geraniol, Citronellsäure und Geranylsäure, wie von Seubert und Mitarbeiter bereits angenommen, sowohl in *P. citronellolis* als auch in *P. aeruginosa* über C₂-Komponenten metabolisiert werden.

Die Gene für den Abbau von Citronellol und Geraniol in *P. citronellolis* und *P. aeruginosa* waren bisher unbekannt, bis auf die Publikation von Diaz-Perez, die während der Durchführung der hier vorliegenden Arbeit veröffentlicht wurde. Diaz-Perez und Mitarbeiter untersuchten der Abbau von Citronellol in *P. aeruginosa* (DIAZ-PEREZ et al., 2004) und konnten im Rahmen ihrer Untersuchungen ein Cluster klonieren, welches 6 Gene enthält, die für den Abbau von azyklischen Terpenen verantwortlich sind. Dieses Cluster enthält zwei Gene für mögliche Carboxylase-Untereinheiten (*gnyA* und *gnyB*, PA2012 und PA2014) sowie andere mögliche Genprodukte, die für den Abbau von azyklischen Terpenen notwendig sind: Citronellyl-CoA-Dehydrogenase (*gnyD*, PA2015), γ -Carboxygeranoyl-CoA-Hydratase (*gnyH*, PA2013), 3-Hydroxy- γ -carboxygeranoyl-CoA-Lyase (*gnyL*, PA2011) und ein Regulatorgen (*gnyR*, PA2016). Durch gezielte Mutagenese von 5 der 6 Gene des *gnyRDBHAL*-Clusters konnte die Vermutung gestützt werden, dass diese Gene am Abbau von azyklischen Terpenen beteiligt sind, da alle Mutanten kein Wachstum auf den Substraten Citronellol, Citronellal, Citronellsäure, Geraniol, Citral und Geranylsäure zeigten. Da bereits bekannt war, dass es sich bei der Geranyl-CoA-Carboxylase und der Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase um biotinabhängige Proteine handelt, wurden biotinylierte Proteine mittels Streptavidin-AP-Konjugat im Western Blot nachgewiesen. Hier konnte gezeigt werden, dass in PAO1-Zellen, die auf Glucose kultiviert wurden, zwei Biotinenzyme mit einer molekularen Masse von 62 kDa und 22 kDa gebildet wurden. In Zellen, die auf Citronellol kultiviert wurden, konnten zusätzlich zu den beiden oben genannten Proteinen zwei weitere

Biotinproteine mit einer molekularen Masse von 73 kDa und 70 kDa nachgewiesen werden. In den von Diaz-Perez und Mitarbeiter erzeugten Mutanten trat jeweils nur noch das Protein mit einer molekularen Masse von 70 kDa auf. Durch das Wachstum all dieser Mutanten auf der Kohlenstoffquelle 6-Methyl-5-hepten-2-on, eine ebenfalls 3-Methyl-verzweigte Komponente, die nach Diaz-Perez und Mitarbeiter wie 3-Methylcrotonyl-CoA abgebaut werden soll, schloss die Gruppe, dass der Leucinabbauweg nicht durch dieses Cluster codiert wird. Vielmehr schlossen sie daraus, dass das *gnyRDBHAL*-Cluster für den von ihnen benannten „Lower Pathway“ des Citronellolabbaus verantwortlich ist, dessen Enzyme die Umsetzung von Citronellyl-CoA zu Geranyl-CoA und dessen weitere Umsetzung zu 7-Methyl-3-oxo-6-octenoyl-CoA katalysieren. Durch Abgleich der Proteinsequenzen des *gny*-Clusters mit der gesamten Proteinsequenz von *P. aeruginosa* konnten durch Diaz-Perez und Mitarbeiter weitere Proteine mit signifikanten Ähnlichkeiten zu den beschriebenen *gny*-Proteinen gefunden werden. Die ORFs PA2888 und PA2891 werden als mögliche Carboxylaseuntereinheiten beschrieben, PA2889 als mögliche Acyl-CoA-Dehydrogenase und PA2890 als mögliche Enoyl-CoA-Hydratase/Isomerase. Da diese Proteine im Leucinabbau bzw. zur weiteren Metabolisierung von 3-Methylcrotonyl-CoA im Abbau von azyklischen Terpenen ebenfalls benötigt werden, wurden sie dem Leucinabbauweg in *P. aeruginosa* zugeordnet (DIAZ-PEREZ et al., 2004). Diese These konnte in der vorliegenden und in Kapitel 2 beschriebenen Arbeit widerlegt werden (HÖSCHLE et al., 2005b; HÖSCHLE et al., 2005a).

Auch im Pflanzenreich scheint der Abbau von Isoprenoiden verbreitet zu sein. So konnte 1999 zum ersten Mal eine GCase aus Blättern von *Zea mays* isoliert und charakterisiert werden (GUAN et al., 1999). Beschrieben wird ebenfalls das Vorhandensein einer GCase-Aktivität in Blättern von *Nicotiana tabaccum*, *Daucus carota* und *Glycine max*. Die aus den Plastiden der Maisblätter isolierte GCase besitzt jedoch Unterschiede zur GCase aus *P. citronellolis*. So konnte in *Zea mays* eine 122 kDa biotinhaltige Untereinheit isoliert werden (75 kDa in *P. citronellolis*). Auch scheint die GCase aus Mais sehr spezifisch für ihr Substrat Geranyl-CoA zu sein, zumindest konnte keine Umsetzung von Methylcrotonyl-CoA gemessen werden (GUAN et al., 1999).

1.3 Ziele dieser Arbeit

Da zu Beginn der vorliegenden Arbeit nur biochemische Aspekte des Abbaus von azyklischen Terpenen in *P. citronellolis* durch die Arbeiten von Seubert & Fall vorlagen, sollte der vorgeschlagene Abbauweg von Citronellol (SEUBERT & FASS, 1964b) in *P. aeruginosa* molekularbiologisch untersucht und die zugehörigen Gene identifiziert werden. Aufgrund der hohen Verwandtschaft von *P. citronellolis* und *P. aeruginosa* lag die Vermutung nahe, dass der Abbauweg in beiden Organismen identisch oder sehr ähnlich abläuft. *P. aeruginosa* PAO1 ist ein opportunistisch-pathogener Organismus, der auf Grund seiner hohen Relevanz für die Medizin bereits vollständig sequenziert wurde (STOVER et al., 2000). In einer vorangegangenen Diplomarbeit sowie einer Studienarbeit, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit betreut wurde, wurden insgesamt 8500 Transposonmutanten von *P. aeruginosa* auf ihr Wachstum auf den Kohlenstoffquellen Citronellol, Geraniol, Citronellsäure und Geranylsäure getestet. Dabei konnten 253 Mutanten isoliert werden, die im Wachstum auf mindestens einer der Kohlenstoffquellen signifikant reduziert waren. Diese Mutanten waren die Grundlage für die weiteren Untersuchungen zum Citronellolabbau in *P. aeruginosa* in der vorliegenden Arbeit.

2 Identifizierung der Gene des Citronellolabbaus in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

2.1 Identifizierung direkt und indirekt beteiligter Gene am Citronellolstoffwechsel

Um den Abbau von Citronellol in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 auf molekularbiologischer Ebene untersuchen zu können, war es notwendig, Mutanten mit Defekten in den Genen für den Abbau von azyklischen Terpenen zu erhalten. Im Vorfeld dieser Arbeit wurden bereits 8500 Mutanten von *P. aeruginosa* PAO1, die durch Transposonmutagenese mit pUTminiTn5-Tc erzeugt wurden (DE LORENZO et al., 1990), auf ihre Fähigkeit zur Verwertung von azyklischen Terpenen untersucht (HÖSCHLE, 2002; SCHÄFER, 2003). Dabei konnten 253 Mutanten mit Defekten im Wachstum auf mindestens einer der Kohlenstoffquellen Citronellol, Geraniol, Citronellsäure und Geranylsäure isoliert werden, von denen einige in dieser Arbeit genauer untersucht wurden.

Alle 253 Mutanten zeigten keinen Unterschied zum Wildtyp im Wachstum auf mineralischen Medien mit Glucose oder Succinat als Kohlenstoffquelle, so dass eine Auxotrophie ausgeschlossen werden konnte. Die zusätzlich isolierten 35 auxotrophen Mutanten (Gruppe IV) wurden nicht weiter untersucht. Innerhalb der Gruppe mit interessanten Phänotypen bezüglich des Citronellolstoffwechsels konnten weitere Einteilungen vorgenommen werden. 39 dieser Transposonmutanten (Gruppe I) zeigten kein bzw. ein deutlich reduziertes Wachstum auf Geraniol. Das Wachstum auf Citronellol, Citronellsäure und Geranylsäure war nicht beeinflusst. Weitere 211 Mutanten (Gruppe III) zeigten unterschiedliche Kombinationen von mehr oder weniger gutem Wachstum auf den azyklischen Terpenen. 129 dieser 211 Transposonmutanten zeigten jedoch zusätzlich ein eingeschränktes Wachstum auf Geraniol. Nur 3 Mutanten konnten keine der vier Kohlenstoffquellen verwerten, zeigten aber ein normales Wachstum auf Glucose, Succinat und Komplexmedium (Gruppe II). Eine Übersicht über die verschiedenen Mutantengruppen ist in Tabelle 2.1 gezeigt.

Tabelle 2.1: Übersicht über die verschiedenen Phänotypgruppen der Transposonmutanten von *P. aeruginosa* PAO1

Gruppe	Phänotyp	Anzahl	Anteil an der Gesamtzahl der untersuchten Mutanten	Anteil an der Gesamtzahl aller Transposonmutanten
PAO1 WT Sm ^r	C+, G+, CS+, GS+	-	-	-
I	C+, G+/-*, CS+, GS+	39	15,4 %	0,46%
II	C-, G-, CS-, GS-	3	1,2%	0,04%
III	alle Kombinationen	211	83,4%	2,48%
	davon mit zusätzlicher Wachstumshemmung auf Geraniol	129	51%	1,52%
IV	auxotroph	35	-	0,41%

Legende: C: Citronellol, G: Geraniol, CS: Citronellsäure, GS: Geranylsäure; +: gutes Wachstum, +/-: schlechtes Wachstum, -: kein Wachstum;
G+/-*: Gruppe enthält sowohl Mutanten mit schlechtem Wachstum auf Geraniol als auch Mutanten, die kein Wachstum auf Geraniol zeigten.

Die hohe Anzahl an Mutanten, die Defekte in der Verwertung von Geraniol besitzen, aber keinerlei Wachstumshemmung auf Citronellol, Citronellsäure und Geranylsäure zeigten (Gruppe I), war unerwartet, da angenommen wurde, dass Citronellol und Geraniol durch dieselben Enzyme zu den zugehörigen Säuren (Citronellsäure und Geranylsäure) oxidiert werden (CANTWELL et al., 1978; SEUBERT & FASS, 1964b). Wäre dies der Fall, so hätten diese Mutanten dieselben Wachstumsdefizite im Abbau von Citronellol aufweisen müssen. Bei Southern Blot Analysen mehrerer Mutanten aus dieser Gruppe konnten mit Hilfe einer transposonspezifischen Sonde Fragmente unterschiedlicher Größen ermittelt werden, was zeigt, dass unterschiedliche Gene von der Mutation betroffen waren. Dieses Ergebnis ließ vermuten, dass zusätzlich mehrere Gene an der Oxidation von Geraniol zur Geranylsäure beteiligt sind, die an der Umsetzung von Citronellol zur Citronellsäure nicht beteiligt sind.

Zur Identifizierung der verschiedenen Transposoninsertionsorte wurden verschiedene Vertreter aus den oben genannten Gruppen ausgesucht und genauer untersucht. Mit Hilfe einer Southern Blot Analyse wurde die Größe des transposontragenden Fragmentes ermittelt, dieses aus der genomischen DNA isoliert und in den Vektor pBluescript SK⁺ kloniert. Nach der Ansequenzierung der

rekombinanten Plasmide konnten die erhaltenen Sequenzdaten mit der Datenbank von *P. aeruginosa* (www.pseudomonas.com; updated database) verglichen und somit der Insertionsort des Minitransposons bestimmt werden. In der folgenden Tabelle sind verschiedene Klone, ihr Phänotyp, der Insertionsort des Transposons im Genom von *P. aeruginosa* und der von der Mutation betroffene ORF angegeben.

Tabelle 2.2: Übersicht über die Transposoninsertionsorte in verschiedenen Mutanten von *P. aeruginosa* PAO1 (geordnet nach den verschiedenen Phänotypengruppen von Tabelle 2.1)

PAO1-Klon	Phänotyp	Insertionsort des miniTn5 im Genom	Betroffener ORF
11/10/5*	C+ G- CS+ GS+	3 392 394 bp	PA3028 <i>moeA2</i> (molybdenum cofactor biosynthesis protein)
11/11/1*	C+ G- CS+ GS+	3 392 394 bp	PA3028 <i>moeA2</i> (molybdenum cofactor biosynthesis protein)
16/1/2	C+ G- CS+ GS+	5 304 628 bp	PA4725 two component sensor <i>cbrA</i> (carbon catabolism)
16/2/1	C+ G- CS+ GS+	4 395 015 bp	PA3922 conserved hypothetical protein
36D/2/7	C+ G+/- CS+ GS+	3 396 862 bp	Intergenischer Bereich zwischen PA3032 (<i>snr1</i>) und PA3033 (hypothetical protein)
22B/1/1	C- G- CS- GS-	3 243 626 bp	PA2890 (probable enoyl-CoA-hydratase/isomerase)
36B/1/1*	C- G- CS- GS-	1 761 887 bp	PA1617 (probable AMP-binding enzyme)
36B/2/1*	C- G- CS- GS-	1 761 887 bp	PA1617 (probable AMP-binding enzyme)
15/12/9	C+ G+/- CS+/- GS+	1 719 739 bp	PA1580 <i>gltA</i> (citrate synthase)

Legende: C: Citronellol, G: Geraniol, CS: Citronellsäure, GS: Geranylsäure; +: gutes Wachstum, +/-: schlechtes Wachstum, -: kein Wachstum;
* Mutanten stammen jeweils aus demselben Konjugationsexperiment, so dass anzunehmen ist, dass es sich um Geschwisterklone handelt.

Wie Tabelle 2.2 zeigt, konnten Mutationen mit Einfluss auf den Citronellolstoffwechsel in unterschiedlichen Regionen des Genoms von *P. aeruginosa* lokalisiert werden. Aus den 39 Vertretern der Gruppe I, die ein uneingeschränktes Wachstum auf Citronellol, Citronellsäure und Geranylsäure aufwiesen, jedoch kein oder nur ein stark eingeschränktes Wachstum auf Geraniol zeigten, wurden 5 verschiedene Mutanten ausgewählt und untersucht. Wie aus der Tabelle weiter ersichtlich ist, konnte das Transposon an vier verschiedenen Orten im Genom von *P. aeruginosa* lokalisiert werden. In den Mutanten #11/10/5 und #11/11/1 konnte das Transposon an derselben Basenposition und somit im ORF PA3028 identifiziert werden, dessen Genprodukt in der Datenbank einem Molybdäncofaktor-Biosyntheseprotein zugeordnet wurde. Da beide Mutanten aus demselben Konjugationsexperiment stammen, ist anzunehmen, dass es sich um Geschwisterklone handelt. In *P. aeruginosa* #16/2/1 konnte das Transposon im ORF PA3922, dessen Genprodukt als ein „conserved hypothetical protein“ beschrieben wurde, lokalisiert werden. In Mutante # 36D/2/7 konnte das miniTn5-Tc im intergenischen Bereich zwischen ORF PA3032 und ORF PA3033 nachgewiesen werden. Das Genprodukt von PA3032, auch Cytochrom C Snrl („shared nitrate reduction“) Protein genannt, wird sowohl bei der Assimilation als auch bei der Dissimilation von Nitrat zu Nitrit (molybdänabhängige Prozesse) verwendet (IRANI et al., 1997; KERSCHEN et al., 2001). Das Genprodukt von ORF3033 ist in der Datenbank als ein „hypothetical protein“ beschrieben. Die Mutation im intergenischen Bereich scheint jedoch keinen so starken Effekt zu haben, da ein stark eingeschränktes Wachstum auf Geraniol noch möglich ist. Interessanterweise liegen alle diese Insertionsorte des Transposons jeweils nur wenige Gene von jenen Genen entfernt, die für die Molybdäncofaktorbiosynthese (Moco-Biosynthese) wichtig sind (siehe auch Bild 2.3 im nächsten Kapitel). Mutante #16/1/2, die ebenfalls zur Gruppe I gehört, trägt die Mutation im ORF PA4725, dessen Genprodukt, der Zweikomponentensensor CbrA, für die Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels verantwortlich ist. Weshalb diese Mutation nur die Umsetzung von Geraniol, nicht aber die Verwertung der anderen verwendeten Kohlenstoffquellen beeinflusst, bleibt unklar.

Als Vertreter der Gruppe II wurden die Mutanten #22B/1/1, #36B/1/1 und #36B/2/1 ausgewählt. In den Mutanten #36B/1/1 und #36B/2/1 konnte das Transposon an derselben Genomposition und somit im ORF PA1617, dessen Genprodukt einem

vermeintlichen AMP-Bindeprotein zugeordnet wurde, ermittelt werden. Da beide Mutanten wieder aus demselben Konjugationsexperiment stammen, ist erneut anzunehmen, dass es sich um Geschwisterklone handelt. Das Transposon in Mutante #22B/1/1 konnte im ORF PA2890 lokalisiert werden, dessen Genprodukt als vermeintliche Enoyl-CoA-Hydratase/Isomerase beschrieben ist. Diese Mutante war sehr interessant, da im vorgeschlagenen Abbauweg von Citronellol und Geraniol eine Enoyl-CoA-Hydratase beteiligt ist (SEUBERT & FASS, 1964a).

Der einzigen Vertreter der Gruppe III (#15/12/9) zeigte ein gutes Wachstum auf Citronellol und Geranylensäure, jedoch ein stark eingeschränktes Wachstum auf Geraniol und Citronellsäure. Das Transposon und somit die Mutation konnte im ORF PA1580, der NADH-sensitiven Citratsynthase GltA, einem wichtigen Enzym im Tricarbonsäurezyklus, lokalisiert werden.

Durch die hohe Anzahl an Mutanten mit einem Geraniol-negativen Phänotyp und der Tatsache, dass die Mutationen der Mutanten #11/10/5 und #11/11/1 in einem für die Moco-Synthese wichtigen Protein auftraten, sollte eine Molybdänabhängigkeit der Oxidation von Geraniol zur Geranylensäure untersucht werden. Weiterhin sollte die Mutante #22B/1/1 mit ihrer Mutation in einer Enoyl-CoA-Hydratase in der vorliegenden Arbeit weiter untersucht werden.

2.2 Molybdänabhängige Oxidation von Geraniol zur Geranylensäure

Da bei der Untersuchung der Transposonmutanten eine große Gruppe mit einem Geraniol-negativen Phänotyp auftrat, sollte die Umsetzung von Geraniol zur Geranylensäure unter Berücksichtigung einer Molybdänabhängigkeit genauer untersucht werden.

Für diese Untersuchungen wurde die Mutante #11/10/5 aus der Gruppe I gewählt. Diese Mutante zeigte ein uneingeschränktes Wachstum auf Citronellol, Citronellsäure und Geranylensäure, jedoch kein Wachstum auf Geraniol. Der Insertionsort des Transposons konnte an der Position 3 392 394 im Genom von *P. aeruginosa* ermittelt werden (Tabelle 2.2). Die Position liegt innerhalb des ORF PA3028 (*moeA2*). Das zugehörige Genprodukt weist hohe Ähnlichkeiten zu Molybdäncofaktor-(Moco)-Biosynthese-Proteinen aus *P. syringae*, *P. putida*,

P. fluorescens (jeweils 65% Identität auf der Aminosäureebene) auf. Weiter zeigt dieses Protein eine hohe Ähnlichkeit zu MoeA1 aus *P. aeruginosa* (51% Identität), zu MoeA aus *Escherichia coli* (41%), sowie zu weiteren Proteinen aus verschiedenen Organismen. Durch gezielte Mutagenese (WINDGASSEN et al., 2000) des ORF PA3028 im *P. aeruginosa* Wildtypstamm (Insertionsmutante) und durch die Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps durch Expression eines intakten *moeA2*-Gens (Plasmid pBBR1MCS-5::*moeA2*) in der Mutante #11/10/5 (Mutante #11/10/5K) konnte gezeigt werden, dass der oben beschriebene Phänotyp durch die Insertion des Transposons hervorgerufen wurde. Die Ergebnisse der Wachstumsversuche der verschiedenen Mutanten auf Citronellol und Geraniol sind in Bild 2.1 gezeigt.

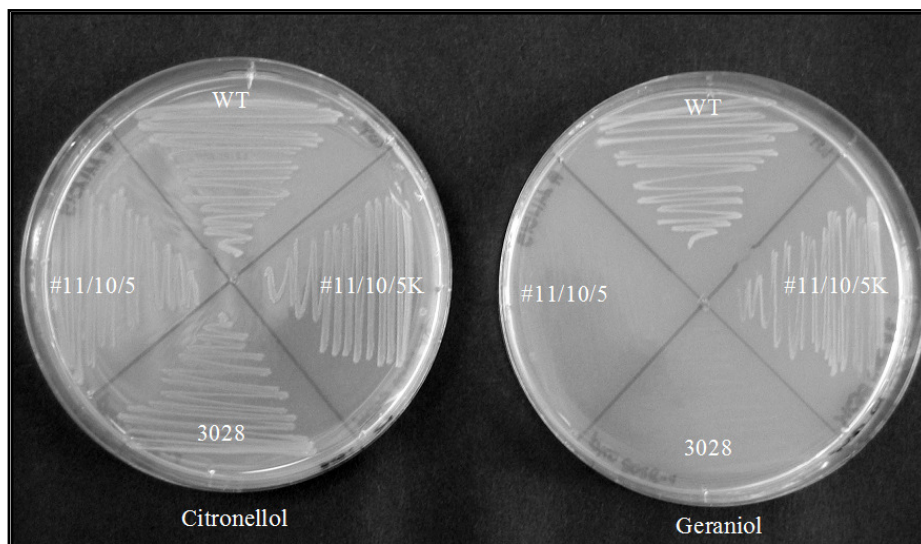


Bild 2.1: Wachstum von *P. aeruginosa* Wildtyp (WT), der Transposonmutante #11/10/5, die Insertionsmutante *P. aeruginosa* Sm^r-Δ3028 und der Mutante #11/10/5K (Mutante #11/10/5 mit Plasmid pBBR1MCS-5::*moeA2*) auf Citronellol und Geraniol, aus HÖSCHLE & JENDROSSEK (2005)

MoeA spielt in der Moco-Biosynthese eine zentrale Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Protein in *E. coli* und *Rhodobacter capsulatus* (LEIMKÜHLER et al., 1999; NICHOLS & RAJAGOPALAN, 2005) essentiell für den Einbau von Molybdätmolybdopterin, eine Vorstufe der verschiedenen Molybdäncofaktoren, ist. Da eine Mutation in diesem, für die Moco-Biosynthese wichtigem Enzym zu einem Geraniol-negativen Phänotypen führt, lag die Vermutung nahe, dass die Oxidation von Geraniol zur Geranylensäure einen Moco-abhängigen Schritt beinhaltet, zumal neben molybdänabhängigen Oxotransferasen (z.B. DMSO-Reduktase, Nitrat-Reduktase) auch molybdänabhängige Hydroxylasen/Dehydrogenasen (z.B. Xanthin-Dehydrogenase) in der Literatur bekannt sind (HILLE, 1999; MOURA et al., 2004).

Um dies zu untersuchen, wurden Wachstumsversuche mit dem Wildtyp von *P. aeruginosa* in Flüssigmedium mit Citronellol, Geraniol, Citronellsäure, Geranolsäure oder Succinat als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle durchgeführt. Sollte tatsächlich ein Moco-abhängiger Schritt bei der Umsetzung von Geraniol zur Geranolsäure beteiligt sein, so sollte dieser durch Wolframat, einem starken Inhibitor molybdänabhängiger Umsetzungen, gehemmt werden können. Bild 2.2 zeigt die Ergebnisse der verschiedenen Wachstumsversuche. Im Kontrollexperiment ohne Wolframat konnte ein für den PAO1-Wildtyp typisches Wachstum auf Citronellol, Geraniol, Citronellsäure, Geranolsäure und Succinat (Bild 2.2A) festgestellt werden. Es zeigten sich jedoch deutliche Unterschiede in den Verdopplungszeiten beim Wachstum auf den verschiedenen Kohlenstoffquellen. Die geringsten Verdopplungszeit wurde beim Wachstum auf Succinat erreicht ($t_d = 1,8h$), gefolgt vom Wachstum auf Citronellsäure ($t_d = 2,3h$), Citronellol ($t_d = 2,9h$), Geraniol ($t_d = 9h$) und Geranolsäure ($t_d = 11h$). In einem zweiten Experiment wurde dem Medium zusätzlich zur jeweiligen Kohlenstoffquelle 10 mM Wolframat zugegeben (Bild 2.2B). Die Verdopplungszeiten beim Wachstum auf Citronellol, Citronellsäure, Geranolsäure und Succinat waren nahezu identisch zu den Verdopplungszeiten beim Wachstum ohne Wolframat im Kontrollexperiment. Beim Wachstum von PAO1 auf Geraniol in Gegenwart von Wolframat konnte ein deutlicher Unterschied festgestellt werden. So konnte gerade eine Verdopplung in der optischen Dichte gemessen werden, bevor das Wachstum komplett eingestellt wurde. Um zu testen, ob diese Wachstumshemmung auf Geraniol durch die spezifische Hemmung molybdänabhängiger Prozesse oder durch einen toxischen Effekt von Wolframat ausgelöst wurde, wurde in einem dritten Versuchsansatz dem Medium neben den jeweiligen Kohlenstoffquellen 10 mM Wolframat und zusätzlich 12 mM Molybdat zugegeben. Sollte es sich um einen toxischen Effekt durch Wolframat handeln, so dürfte in diesem Versuchsansatz ebenfalls kein Wachstum auf Geraniol erfolgen. Handelt es sich jedoch um eine spezifische Hemmung molybdänabhängiger Reaktionen, so müsste diese durch Zugabe einer höheren Konzentration an Molybdat aufgehoben werden können. Bild 2.2C zeigt, dass durch Zugabe von 12 mM Molybdat die Wachstumshemmung von PAO1 auf Geraniol durch Wolframat aufgehoben werden konnte und kein Unterschied zum Wachstum ohne Wolframat und Molybdat im Medium festgestellt wurde. Damit war gezeigt, dass die Oxidation

von Geraniol zur Geranylsäure molybdänabhängige Schritte enthält (HÖSCHLE & JENDROSSEK, 2005).

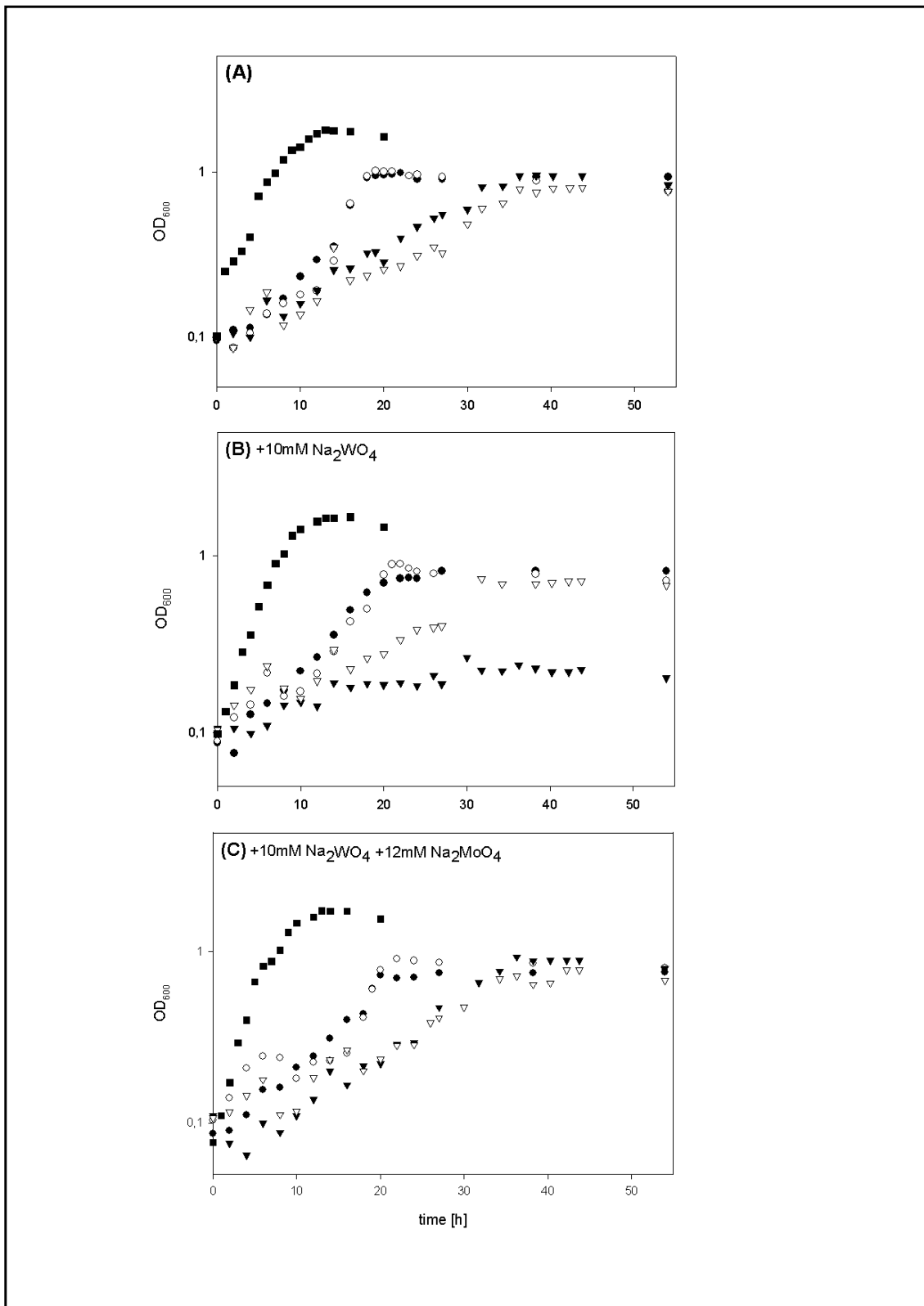


Bild 2.2: Einfluss von Wolframat auf das Wachstum des Wildtyps von *P. aeruginosa* PAO1 in Tris-gepuffertem Medium mit den Kohlenstoffquellen Citronellol (●), Citronellsäure (○), Geraniol (▼), Geranylsäure (▽) und Succinat (■); (B) Zugabe von 10 mM Wolframat; (C) Zugabe von 10 mM Wolframat und 12 mM Molybdat; aus HÖSCHLE & JENDROSSEK (2005)

Für die Umsetzung von Geraniol zu Geranylsäure sind zwei Oxidationsschritte nötig. Um zu untersuchen, welcher dieser Schritte molybdänabhängig ist, wurden der Wildtyp, die Transposonmutante #11/10/5, die Mutante #11/10/5K mit intaktem *moeA2* auf einem Plasmid, und die Mutante *P. aeruginosa* Sm^r-Δ3028 auf Geranial (Citral) kultiviert. Zum Vergleich wurde eine Kultivierung dieser Stämme auf Citronellal durchgeführt. Auf Citronellal zeigten alle Mutanten ein zum Wildtyp vergleichbares Wachstum. Auf Geranial zeigten nur der Wildtyp und die Mutante #11/10/5K ein Wachstum. Mutanten mit defektem *moeA2*-Gen zeigten kein Wachstum. Ebenso konnte bei Wachstumsversuchen auf festem Nährmedium gezeigt werden, dass das Wachstum von PAO1-Wildtyp auf Geranial mit Wolframat gehemmt werden kann. Diese Hemmung kann durch Zugabe einer höheren Konzentration an Molybdat wieder aufgehoben werden. Die Versuche zeigten, dass es sich bei der Oxidation von Geranial zur Geranylsäure um eine molybdänabhängige Reaktion einer Geranialdehydrogenase handelt. Ob die Oxidation von Geraniol zu Geranial ebenfalls molybdänabhängig ist, konnte durch die Ergebnisse dieser Versuche nicht ausgeschlossen werden. Fest steht jedoch, dass die Oxidation von Citronellol zur Citronellsäure nicht mit denselben Enzymen katalysiert wird, wie die Oxidation von Geraniol zur Geranylsäure. Wie Wachstumsversuche von *P. citronellolis* und *P. mendocina* auf Citronellol, Citronellsäure, Geraniol, und Geranylsäure zeigten, konnte keine Hemmung des Wachstums auf Citronellol, Citronellsäure und Geranylsäure durch Wolframat festgestellt werden und lediglich eine leichte Hemmung beim Wachstum auf Geraniol. Daraus kann geschlossen werden, dass die Oxidation von Geraniol zur Geranylsäure in *P. aeruginosa* nicht mit den selben Enzymen wie die Oxidation in *P. citronellolis* und *P. mendocina* ablaufen kann oder dass molybdänunabhängige Isoenzyme in *P. citronellolis* und *P. mendocina* diese Reaktion katalysieren können, so dass keine komplette Wachstumshemmung durch Zugabe von Wolframat auftritt. Die Beteiligung molybdänabhängiger Schritte in *P. aeruginosa* wird weiter gestützt durch die hohe Anzahl an Transposonmutanten, die kein Wachstum auf Geraniol zeigten, da die Synthese von Molybdäncofaktoren mehrere enzymatische Schritte und die Zusammenarbeit vieler Genprodukte benötigt (NICHOLS & RAJAGOPALAN, 2002; WUEBBENS & RAJAGOPALAN, 2003). Eine Mutation in nur einem Gen der Moco-Biosynthese führt zum Verlust der Bildung von aktivem Moco und somit zu einem Geraniol-negativen Phänotyp.

Wie durch Vergleich der Proteinsequenz von MoeA2 mit Proteinen aus *P. aeruginosa* festgestellt werden konnte, ist im Genom ein weiteres MoeA-Protein (MoeA1) enthalten. Weitere Recherchen zeigten, dass neben MoeA mit MoaA und MoaB zwei weitere Enzyme, die in der Moco-Biosynthese an der Bildung des Precursor Z beteiligt sind (LEIMKÜHLER et al., 1999), doppelt im Genom von *P. aeruginosa* vorliegen. Alle an der Biosynthese von Molybdäncofaktoren beteiligten Gene liegen teilweise räumlich voneinander getrennt im ganzen Genom. In Bild 2.3 ist die Verteilung der Moco-Biosynthesegene im Genom schematisch dargestellt.

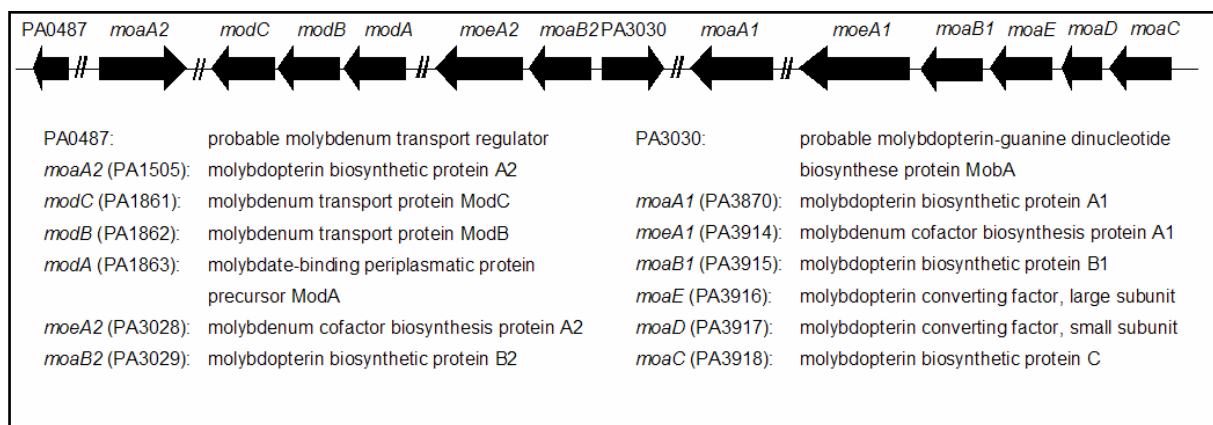


Bild 2.3: Gene für die Molybdäncofaktor-Biosynthese in *P. aeruginosa* PAO1 (Daten zur Erstellung der Graphik aus www.pseudomonas.com).

Joshi und Rajagopalan konnten zeigen, dass *P. aeruginosa* zwei verschiedene Molybdäncofaktoren, nämlich Molybdopterin (MPT) und Molybdopterin-Guanin-Dinucleotid (MGD) enthält (JOSHI & RAJAGOPALAN, 1994), wobei Molybdopterin in die Xanthin-Dehydrogenase eingebaut wird.

Um herauszufinden, welcher dieser beiden Molybdäncofaktoren durch den Defekt im *moeA2*-Gen nicht mehr synthetisiert wird bzw. welcher Cofaktor an der Oxidation von Geraniol zur Geranylensäure beteiligt ist, wurde die Aktivität der Xanthin-Dehydrogenase bestimmt (JOHNSON et al., 1991). Durch Induktion der Xanthin-Dehydrogenase mittels Hypoxanthin konnte sowohl im Rohextrakt vom Wildtyp als auch in den Rohextrakten der Transposonmutante #11/10/5 und der Mutante #11/10/5K mit intaktem *moeA2* auf einem Plasmid eine vergleichbare Aktivität von ungefähr 0,15 mU/mg gemessen werden. In den Rohextrakten von uninduzierten Zellen konnte eine rund 10-fach niedrigere Grundaktivität gemessen werden.

Dieses Ergebnis sowie die Tatsache, dass *P. aeruginosa* zwei MoeA-Proteine besitzt und zwei verschiedene Molybdäncofaktoren synthetisiert werden, lassen vermuten, dass MoeA2 nicht an der Synthese des Molybdopterin-Cofaktors beteiligt ist und somit dieser Cofaktor keine Rolle bei Oxidation von Geraniol zur Geranolsäure spielt. Vielmehr lässt dieses Ergebnis vermuten, dass der Cofaktor Molybdopterin-Guanin-Dinucleotid an der Oxidation von Geraniol zur Geranolsäure beteiligt ist.

2.3 Das *atu*-Cluster für den Abbau von azyklischen Terpenen

Um Gene zu identifizieren, die direkt am Abbau von azyklischen Terpenen beteiligt sind, wurden Transposonmutanten untersucht, die kein Wachstum auf Citronellol, Geraniol, Citronellsäure und Geranolsäure zeigten und deren Wachstum auf Glucose und Succinat nicht beeinträchtigt war. Wie die Tabellen 2.1 und 2.2 zeigten, konnten 3 Mutanten mit diesem Phänotyp isoliert werden. Das Transposon in den Mutanten #36B/1/1 und #36B/2/1 konnte im ORF PA1617, dessen Genprodukt einem möglichen AMP-Bindeprotein zugeordnet wurde, lokalisiert werden. Das Transposon in Mutante #22B/1/1 konnte im ORF PA2890 lokalisiert werden, dessen Genprodukt in der Datenbank als eine möglichen Enoyl-CoA-Hydratase/Isomerase beschrieben ist. Da eine Enoyl-CoA-Hydratase im vorgeschlagenen Abbauweg vorkommt, schien diese Mutante sehr interessant zu sein.

Unabhängig von dieser Mutante wurde in der vorliegenden Arbeit im Genom von *P. aeruginosa* nach biotinabhängigen Carboxylasen gesucht und deren flankierende Bereiche analysiert. Mit den ORFs PA2886-PA2893 konnte ein Cluster gefunden werden, dessen Genprodukte neben zwei Untereinheiten einer potentiellen biotinabhängigen Carboxylase auch weitere potentielle Proteine enthielt, die für den von Seubert & Fass vorgeschlagenen Abbau von Citronellol und Geraniol zu 7-Methyl-3-oxo-6-octenoyl-CoA (SEUBERT & FASS, 1964b) notwendig sind. Das gefundene Cluster ist in Bild 2.4 dargestellt.

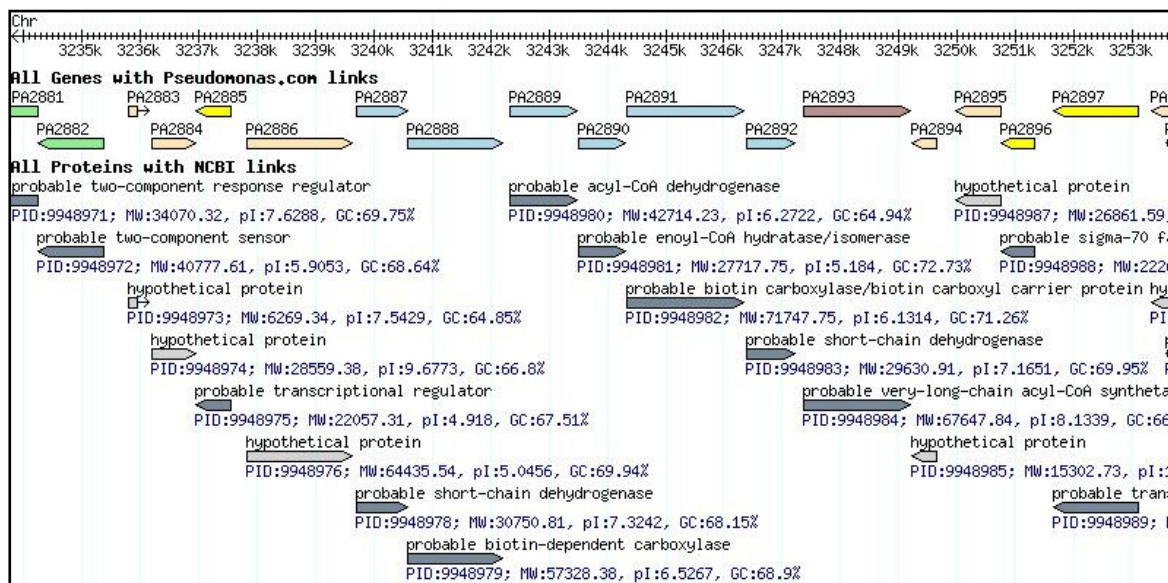


Bild 2.4: Potentielles Cluster für den Citronellolabbau in *P. aeruginosa* (aus www.pseudomonas.com)

Da der Insertionsort des Transposons in Mutante #22B/1/1 auch innerhalb dieses Clusters lokalisiert werden konnte, lag die Vermutung nahe, dass es sich um Gene handelt, die am Abbau von Citronellol und Geraniol in *P. aeruginosa* beteiligt sind.

Durch Diaz-Perez wurde während der Erstellung der vorliegenden Arbeit ein *gny*-Cluster (*gnyRDBHAL*; ORF PA2011-PA2016) aus *P. aeruginosa* beschrieben, welches ebenfalls am Abbau von linearen Terpenen beteiligt ist (DIAZ-PEREZ et al., 2004), da Insertionen innerhalb dieses Genclusters zu einem Verlust des Wachstums auf azyklischen Terpenen führten. Das *gny*-Cluster enthielt ebenfalls zwei Gene, deren Genprodukte hohe Ähnlichkeiten zu Carboxylaseuntereinheiten aufwiesen.

Um festzustellen, welche Carboxylasen und somit auch welches der beiden Cluster nun für den Abbau von Citronellol und Geraniol zu 7-Methyl-3-oxo-6-octenoyl-CoA und für den weiteren Abbau von 3-Methylcrotonyl-CoA zu Acetyl-CoA und Acetoacetat zuständig sind, wurde ein proteinbiochemischer Ansatz gewählt. Da es sich sowohl bei der Geranyl-CoA-Carboxylase (GCCase) als auch bei der Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase (MCCase) um ein biotinabhängiges Protein handelt, sollte die Induktion biotinhaltiger Enzyme in *P. aeruginosa* beim Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen untersucht werden. Als Kohlenstoffquellen wurden Glucose, Citronellsäure und Isovaleriansäure ausgewählt. Sollte der bisher angenommene Abbauweg für *P. citronellolis* (SEUBERT & FASS, 1964b) und die

Tatsache, dass beim Wachstum von *P. citronellolis* auf Citronellsäure neben der GCCase auch die MCCase und beim Wachstum auf Isovaleriansäure nur die MCCase induziert werden (FALL & HECTOR, 1977; HECTOR & FALL, 1976a; HECTOR & FALL, 1976b), auch in *P. aeruginosa* gültig sein, so müssten beim Wachstum auf Citronellsäure sowohl die GCCase als auch die MCCase induziert werden. Beim Wachstum auf Isovaleriansäure dürfte nur die MCCase induziert werden. Das Wachstum auf Glucose diene zur Kontrolle, da unter diesen Bedingungen weder die GCCase noch die MCCase induziert sein sollte.

Nach Kultivierung von Wildtypzellen von *P. aeruginosa* in Minimalmedium mit 0,5% Glucose und Minimalmedium mit 0,1% Glucose und 0,2% Natriumcitronellat bzw. 0,2% Natriumisovalerat wurde der gewonnene Rohextrakt über an eine Matrix gekoppeltes monomeres Avidin aufgereinigt. Da Avidin sehr spezifisch an Biotin bindet, konnten somit alle für die Untersuchung interessanten biotinhaltigen Proteine von allen anderen Proteinen im Rohextrakt abgetrennt werden. Durch die Verwendung von monomerem Avidin konnten die Biotinproteine im nativen Zustand eluiert werden, so dass neben den biotinhaltigen Untereinheiten auch die biotinfreien Untereinheiten gewonnen werden konnten. Die aufgereinigten Proteine wurden mit einem denaturierenden SDS-Gel aufgetrennt und im anschließenden Western Blot mit Streptavidin-AP-Konjugat auf Biotin untersucht. In Bild 2.5 sind SDS-Gel und anschließender Western Blot gezeigt. In Glucose gewachsenen Zellen konnte nur ein biotinhaltiges Protein mit einer molekularen Masse von ungefähr 63 kDa gefunden werden (Bild 2.5B). Dieses Protein scheint konstitutiv exprimiert zu werden, da es bei mit Citronellsäure und bei mit Isovaleriansäure gewachsenen Zellen ebenfalls auftauchte und scheint somit keine Rolle bei der Carboxylierung von methylverzweigten Komponenten zu spielen. Im Rohextrakt Citronellsäure kultivierter Zellen konnten neben dem eben genannten Protein zwei weitere biotinhaltige Polypeptide mit molekularen Massen von ungefähr 71 kDa und 74 kDa gefunden werden. Da beim Wachstum auf linearen Terpenen beide Carboxylasen (MCCase und GCCase) induziert werden sollten, müsste es sich bei diesen beiden Proteinen um die biotinhaltigen Untereinheiten der GCCase und MCCase handeln. Im Rohextrakt mit Isovaleriansäure gewachsener Zellen konnte neben dem 63 kDa-Protein noch ein Polypeptid mit einer molekularen Masse von ungefähr 74 kDa gefunden werden. Das 71 kDa-Protein konnte definitiv nicht nachgewiesen werden. Nach dem vorgeschlagenen Abbauweg (SEUBERT & FASS, 1964b) und den Untersuchungen

von Hector & Fall (FALL & HECTOR, 1977; HECTOR & FALL, 1976a; HECTOR & FALL, 1976b) wird die GCase nur beim Wachstum auf Citronellsäure induziert. So müsste es sich bei dem Polypeptid mit einer molekularen Masse von 74 kDa um die Biotinuntereinheit der MCase und beim Polypeptid mit einer molekularen Masse von 71 kDa um die Biotinuntereinheit der GCase handeln. Damit scheinen die Größen der Biotinuntereinheiten der MCase und GCase unterschiedlich zu den Größen in *P. citronellolis* zu sein, denn hier konnten die molekularen Massen der Biotinuntereinheiten mit einer Größe von 73 kDa (MCase) und 75 kDa (GCase) bestimmt werden (FALL, 1981). Vergleicht man das Ergebnis mit den Resultaten von Diaz-Perez, so können nur Unterschiede von 1 kDa im Hinblick auf die Masse der Biotinproteine festgestellt werden. Dieser Massenunterschied ist jedoch zu gering, um signifikant zu sein. Auch Diaz-Perez konnte auf mit Glucose als Kohlenstoffquelle gewachsenen Zellen ein biotinhaltiges Polypeptid mit einer molekularen Masse von 62 kDa detektieren, das konstitutiv exprimiert wird. In mit Citronellsäure gewachsenen Zellen konnten ebenfalls zwei weitere biotinhaltige Proteine mit molekularen Massen von 70 kDa und 73 kDa identifiziert werden (DIAZ-PEREZ et al., 2004), wobei das 73 kDa-Protein in allen Mutanten nicht mehr induziert wurde. Anhand dieser Ergebnisse und durch die Tatsache, dass die MCase in *P. citronellolis* eine kleinere molekulare Masse als die GCase aufwies, schlossen Diaz-Perez und Mitarbeiter daraus, dass es sich beim 70 kDa-Protein um die biotinhaltige MCase-Untereinheit und beim 73 kDa-Protein um die biotinhaltige GCase-Untereinheit handelt. Mit Isovaleriansäure gewachsene Zellen wurden nicht untersucht.

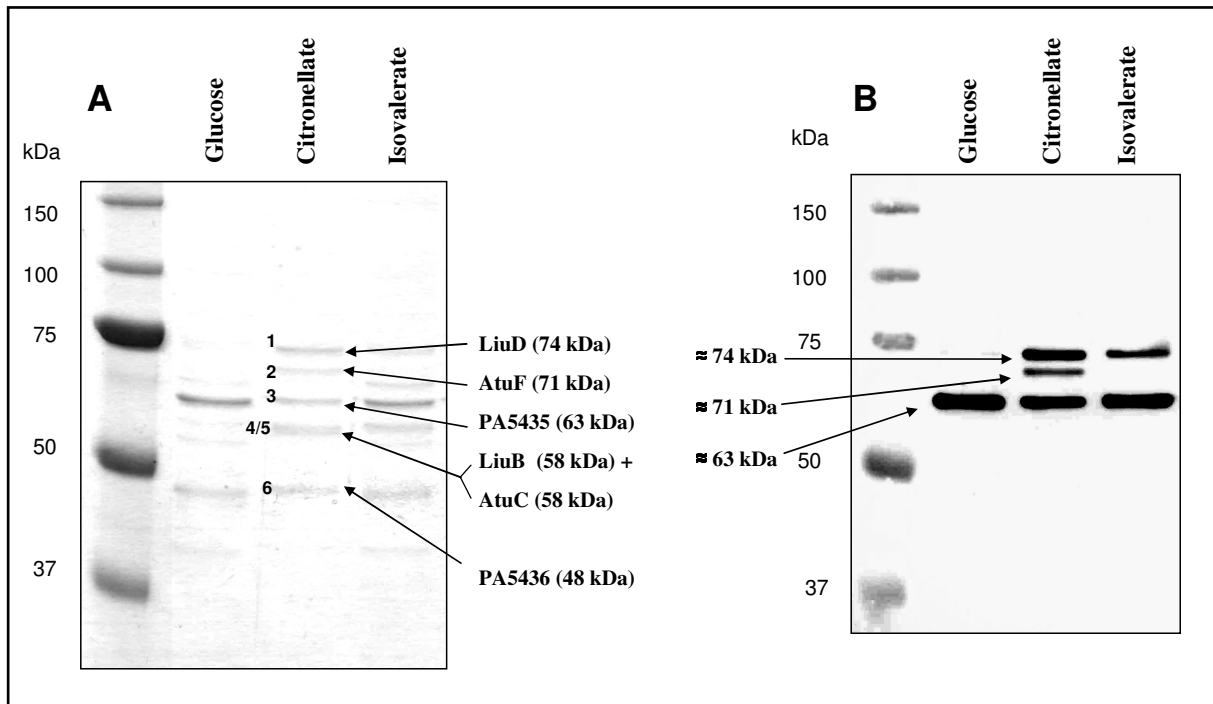


Bild 2.5: SDS-Gel und Western Blot Analyse von biotinhaltenen Proteinen in *P. aeruginosa* PAO1 nach der Avidinaufreinigung (HÖSCHLE et al., 2005b). (A) Mit Coomassie-blue gefärbtes 10%iges SDS Gel, (B) auf PVDF-Membran übertragene Proteine. Proteine mit einem MW kleiner als ~ 25 kDa sind aus dem Gel ausgelaufen; aus HÖSCHLE et al. (2005b)

Um nun genau zeigen zu können, welche biotinhaltenen Proteinuntereinheiten an der Carboxylierung von methylverzweigten Komponenten beteiligt sind, wurde neben den biotinhaltenen Polypeptiden auch alle biotinfreien Polypeptide mit Citronellsäure gewachsener Zellen (Bild 2.5A) aus einem mit Coomassie gefärbten SDS-Gel ausgeschnitten und ein tryptischer Fingerprint mit anschließender ESI-MS-basierender Aminosäuresequenzierung durchgeführt (Durchführung erfolgte durch Dr. V. Gnau von der Universität Tübingen). Von jedem biotinhaltenen Polypeptid wurden 13 Fragmente analysiert und mit den Proteinsequenzen von *P. aeruginosa* verglichen. Das 63 kDa-Protein (Bande Nr. 3), welches konstitutiv exprimiert wurde, und in allen Wachstumsexperimenten auftrat, konnte eindeutig dem Genprodukt von ORF PA5435, einer möglichen Acetyl-CoA-Carboxylase/Transcarboxylase-Untereinheit, in *P. aeruginosa* zugeordnet werden. Das 74 kDa-Protein (Bande Nr. 1), welches sowohl in mit Isovaleriansäure als auch in mit Citronellsäure als Kohlenstoffquelle gewachsenen Zellen induziert wurde, konnte eindeutig dem Genprodukt von ORF PA2012 (*liuD*, *gnyA*), das 71 kDa-Protein (Bande Nr. 2), welches nur in mit Citronellsäure gewachsenen Zellen induziert wurde, eindeutig dem Genprodukt von ORF PA2891 (*atuF*) zugeordnet werden. Die drei biotinfreien

Polypeptide (Banden Nr. 4/5 und Bande Nr. 6) konnten den Genprodukten von ORF PA2014 (*liuB*, *gnyB*; 63 kDa) und PA2888 (*atuC*; 63 kDa) und dem Genprodukt von ORF PA5436 zugeordnet werden, und stellen somit die biotinfreien Untereinheiten der Carboxylasen dar. Die Banden 4 und 5 konnten aufgrund ihrer sehr ähnlichen Masse im SDS-Gel nicht getrennt werden. Die nach der DNA-Sequenz theoretisch berechneten molekularen Massen von AtuF und LiuD sind mit 71,7 kDa und 71,3 kDa in der Pseudomonas-Datenbank angegeben. Der Unterschied zu den tatsächlich bestimmten molekularen Massen lässt sich nicht erklären, wird aber in SDS-Gelen oft beobachtet und könnte an der individuellen Aminosäuresequenz der Proteine liegen. Das erhaltene Ergebnis war ein klarer Widerspruch zu den Interpretationen von Diaz-Perez. Es konnte gezeigt werden, dass das 71 kDa-Protein und somit AtuF nur in mit Citronellsäure als Kohlenstoffquelle gewachsenen Zellen induziert wurde und es sich somit um die biotinhaltige Untereinheit der GCCase handelt müsste. Da das 74 kDa-Protein und somit LiuD sowohl in mit Citronellsäure gewachsenen als auch in mit Isovaleriansäure gewachsenen Zellen induziert wurde, müsste es sich hierbei um die Biotinuntereinheit der MCCase handeln. Es stellte sich nun die Frage, wie es zu diesem Widerspruch kommen konnte. Diaz-Perez und Mitarbeiter schlossen aus ihren Ergebnissen und der Tatsache, dass das Wachstum aller Mutanten im *liu*-Cluster (vormals *gny*-Cluster) auf der Kohlenstoffquelle 6-Methyl-5-hepten-2-on (Fluka, Steinheim, Deutschland) nicht beeinträchtigt war, dass der Abbauweg von Leucin voll funktionsfähig ist. Die Komponente 6-Methyl-5-hepten-2-on mit acht Kohlenstoffatomen soll nach ihren Angaben auf der Stufe des Methylcrotonyl-CoA (fünf Kohlenstoffatome) in den Leucinabbau einfließen. Um dies zu überprüfen, wurde der Wildtyp von *P. aeruginosa* auf der Kohlenstoffquelle 6-Methyl-5-hepten-2-on kultiviert. Da überraschenderweise kein signifikantes Wachstum festgestellt werden konnte, wurden weitere 6 verschiedene Stämme von *P. aeruginosa* mit verschiedenen Methoden und verschiedenen Konzentration der Kohlenstoffquelle getestet. Dazu wurde die Kohlenstoffquelle in den Agar injiziert, ein mit 6-Methyl-5-hepten-2-on getränkter Filter in den Deckel der Agarplatte gegeben oder die Kohlenstoffquelle in einer gesättigten Atmosphäre in geschlossenen Gefäßen dargereicht. Die untersuchten Stämme (B104, CF-3MR, HAB911, HABS1, PA81 und PAC1) zeigten ebenfalls wie *P. aeruginosa* PAO1 auch nach Inkubationszeiten bis zu einer Woche bei 30°C oder 37°C kein stärkeres Wachstum als die Kontrollen ohne Kohlenstoffquelle. Diese Versuche zeigten, dass

6-Methyl-5-hepten-2-on als Substrat von *P. aeruginosa* nicht umgesetzt werden kann und somit auch keine Aussage über die Funktionsfähigkeit des Leucinabbaus geben kann. Hierzu eignen sich Leucin und Isovaleriansäure, die bekanntlich über den Leucinabbauweg metabolisiert werden (LENGELER et al., 1999).

Durch die gezielte Mutagenese (WINDGASSEN et al., 2000) von *AtuF* (ORF PA2891), einer biotinhaltigen Carboxylaseuntereinheit, sollten die eigenen Interpretationen der Ergebnisse noch weiter gestützt werden. Die erzeugte Mutante *P. aeruginosa* PAO1 Sm^r *ins-atuF* zeigte kein Wachstum auf den linearen Terpenen (Citronellole, Geraniol, Citronellsäure und Geranolsäure). Das Wachstum der Mutante auf Leucin und Isovaleriansäure zeigte keinen Unterschied zum Wildtyp, was bedeutet, dass der Leucinabbau in dieser Mutante voll funktionsfähig war. Das Wachstum auf Glucose, Succinat und Acetat war ebenfalls unbeeinflusst (Daten nicht gezeigt). Die Western Blot Analyse der aufgereinigten Biotinproteine mit Citronellsäure und Isovaleriansäure als Kohlenstoffquelle gewachsener Zellen dieser Mutante zeigte ebenfalls, dass ein 74 kDa-Polypeptid in beiden Fällen induziert wurde, während das 71 kDa-Polypeptid in mit Citronellsäure gewachsenen Zellen nicht induziert wurde (Bild 2.6). Folglich handelt es sich bei dem zerstörten Genprodukt um die biotinhaltige Untereinheit der GCCase. Ein 63 kDa-Protein wurde konstitutiv in allen durchgeführten Wachstumsexperimenten exprimiert.

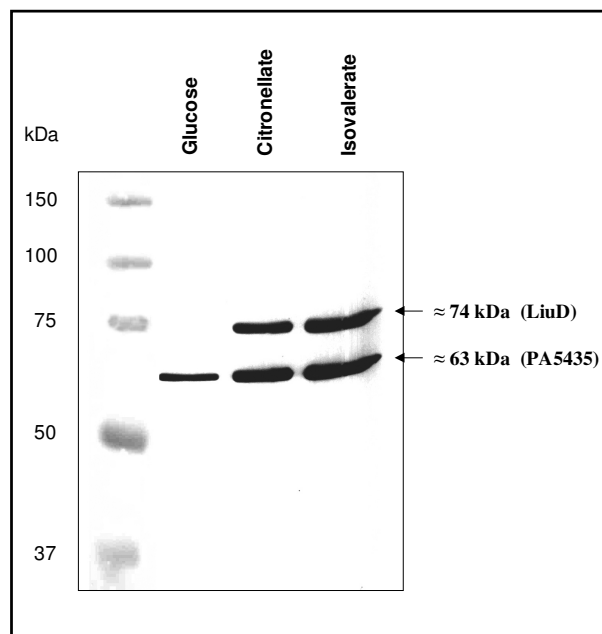


Bild 2.6: Western Blot Analyse biotinhaltiger Proteine in Avidin-gereinigtem Rohextrakt der Insertionsmutante *P. aeruginosa* PAO1 Sm^r *ins-atuF*. Wachstum auf Glucose (0,5%), Glucose (0,1%) mit Citronellsäure (0,2%) und Glucose (0,1%) mit Isovaleriansäure (0,2%). Proteine mit einem MW kleiner als ~ 25 kDa sind aus dem Gel ausgelaufen; aus HÖSCHLE et al. (2005b).

Nach einer Trypsin-Fingerprint-Analyse und anschließender Aminosäuresequenzierung aller Proteine (durchgeführt von Dr. V. Gnau, Universität Tübingen) konnte das biotinhaltige 63 kDa-Protein erneut dem Genprodukt von ORF PA5435 zugeordnet werden. Das 74 kDa-Biotinprotein konnte eindeutig LiuD zugeordnet werden. Die biotinfreien Polypeptide konnten zweifelsfrei als LiuB (58 kDa) und als Genprodukt von ORF PA5436 (48 kDa) identifiziert werden. Somit war eindeutig gezeigt, dass LiuD die biotinhaltige und LiuB die biotinfreie Untereinheit der MCase darstellen und AtuF und AtuC die Untereinheiten der GCase sind (HÖSCHLE et al., 2005b).

Weiterhin wurden die Proteinsequenzen der beiden Cluster aus *P. aeruginosa* mit dem Genom von *P. putida* KT2440, einem nahen verwandten und ebenfalls sequenzierten Mikroorganismus, verglichen. *P. putida* KT2440 besitzt die Fähigkeit, auf Leucin und Isovaleriansäure zu wachsen. Er ist jedoch nicht in der Lage, azyklische Terpene wie Citronellol und Citronellsäure zu verwerten und sollte somit keine Gene für den Abbau von Terpenen besitzen (CANTWELL et al., 1978; SCHAEFFER et al., 1979). Im Genom von *P. putida* KT2440 konnte ein Cluster mit vier Genen (PP4064-PP4067) gefunden werden, dessen Genprodukte mit 67-87% Aminosäureidentität eine sehr hohe Ähnlichkeit zu den Genprodukten des Clusters *liuA-liuE* aufweisen, die mit 35-51% Aminosäureidentität aber eine deutlich geringere Ähnlichkeit zu Genprodukten des Clusters *atuA-atuH* haben. Aufgrund dieser hohen Ähnlichkeit auf Aminosäureebene liegt die Vermutung nahe, dass es sich um die Gene für den Leucinabbau in *P. putida* KT2440 bzw. in *P. aeruginosa* PAO1 handelt. Aus diesem Grunde wurde das von Diaz-Perez veröffentlichte *gny*-Cluster (DIAZ-PEREZ et al., 2004) in das *liu*-Cluster (leucin and isovalerate utilization) umbenannt. Das Cluster mit den ORFs PA2886 bis PA2893 wurde auf Grund des Phänotyps der Mutante *P. aeruginosa* PAO1 Sm^r ins-*atuF* als *atu*-Cluster (acyclic (mono-)terpene utilization) bezeichnet.

Um jedoch eindeutig zu zeigen, dass es sich beim *liu*-Cluster um Gene für den Leucinabbau handelt, sollten noch weitere Versuche durchgeführt werden.

2.4 Das *liu*-Cluster für den Abbau von Leucin und Isovaleriansäure

Wie im vorigen Kapitel bereits gezeigt werden konnte, scheint das *liu*-Cluster sowohl essentiell für den Abbau von Leucin und Isovaleriansäure als auch neben dem *atu*-Cluster an der Verwertung azyklischer Terpene beteiligt zu sein. Diese These sollte nun durch weitere Versuche gestützt werden.

Sowohl die durch gezielte Mutagenese hergestellte Insertionsmutante *P. aeruginosa* PAO1 Sm^r ins-*atuF*, mit einer Mutation in der biotinhaltigen Carboxylaseuntereinheit, als auch die Transposonmutante #22B/1/1, mit einer Mutation in der vermeintlichen Enoyl-CoA-Hydratase/Isomerase (*atuE*), zeigten kein Wachstum auf Citronellol, Geraniol, Citronellsäure und Geranylsäure. Bei der Umsetzung von Leucin und Isovaleriansäure konnte jedoch kein Unterschied zum Wildtyp festgestellt werden, was zeigt, dass in diesen Mutanten ein funktionsfähiger Leucinabbauweg vorhanden sein muss. Um nun das Wachstum von Mutanten im *liu*-Cluster, welches sehr wahrscheinlich für den Abbau von Leucin verantwortlich ist, zu untersuchen, wurden durch gezielte Mutagenesen (WINDGASSEN et al., 2000) die Gene *liuD*, dessen Genprodukt die biotinhaltige Carboxylaseuntereinheit darstellt, und *liuC*, dessen Genprodukt eine vermeintliche Enoyl-CoA-Hydratase darstellt, zerstört. Die Insertionsmutante *P. aeruginosa* PAO1 Sm^r ins-*liuD* zeigte ebenso wie die Insertionsmutante *P. aeruginosa* PAO1 Sm^r ins-*atuF* kein Wachstum auf den azyklischen Terpenen. Beim Wachstum auf Leucin und Isovaleriansäure zeigte sich jedoch ein deutlicher Unterschied. Während das Wachstum von *P. aeruginosa* PAO1 Sm^r ins-*atuF* auf diesen Kohlenstoffquellen nicht beeinflusst war, konnte die Insertionsmutante *P. aeruginosa* PAO1 Sm^r ins-*liuD* diese nicht mehr umsetzen. Das Wachstum auf Glucose, Succinat und Acetat war bei beiden Mutanten nicht beeinflusst. Die Insertionsmutante *P. aeruginosa* PAO1 Sm^r ins-*liuC* zeigte wie die Transposonmutante #22B/1/1 (*atuE*) kein Wachstum auf Citronellol, Geraniol und Geranylsäure, jedoch ein schwaches, verglichen mit dem Wildtyp stark eingeschränktes Wachstum auf Citronellsäure. Auch hier konnte beim Wachstum auf Leucin und Isovaleriansäure ein deutlicher Unterschied festgestellt werden. So zeigte die *liuC*-Mutante auch nach mehrtägiger Inkubation kein Wachstum auf Leucin und Isovaleriansäure während das Wachstum der *atuE*-Mutante #22B/1/1 auf diesen Kohlenstoffquellen keinen Unterschied zum Wildtyp zeigte. Die Wachstumsversuche

dieser Mutanten zeigten schon deutlich, dass das *liu*-Cluster essentiell für die Umsetzung von Leucin und Isovaleriansäure sein muss. Im vorherigen Kapitel konnte bereits gezeigt werden, dass im Genom von *P. putida* KT2400 ein Cluster mit vier Genen (PP4064-PP4067) vorhanden ist, dessen Genprodukte mit 67-87% Aminosäureidentität sehr hohe Ähnlichkeiten zu Genprodukten des *liu*-Clusters aufweisen. Da der Abbau von azyklischen Terpenen bisher nur in *P. citronellolis*, *P. aeruginosa* und *P. mendocina* nachgewiesen werden konnte (CANTWELL et al., 1978; SCHAEFFER et al., 1979), sollten andere Pseudomonaden, die in der Lage sind, Leucin und Isovaleriansäure umzusetzen, keine Gene für den Abbau von Terpenen besitzen.

Beim Abgleich der Proteinsequenz des *liu*-Clusters mit den Proteinsequenzen der bereits sequenzierten Genome von *P. fluorescens* Pf-5 und *P. syringae tomato str.* DC3000 konnten Cluster, deren Genprodukte eine Ähnlichkeit von 67-89% und 65-87% Aminosäureidentität zu den Genprodukten des *liu*-Clusters aufwiesen, gefunden werden. Die Cluster der verschiedenen Pseudomonaden sind in Bild 2.7 schematisch dargestellt. Im Vergleich zum *atu*-Cluster in *P. aeruginosa* (Bild 2.7A) besitzen alle *liu*-Cluster 5 Gene sowie ein Regulatorgen (Bild 2.7 C-F), die entweder als Cluster vorliegen oder im Genom verteilt sind. Diese hohen Ähnlichkeiten und die Tatsache, dass Mutanten in den *liu*-Genen von *P. aeruginosa* kein Wachstum auf Leucin und Isovaleriansäure zeigten, lassen vermuten, dass alle diese Cluster am Abbau von Leucin und Isovaleriansäure in den jeweiligen Organismen beteiligt sind.

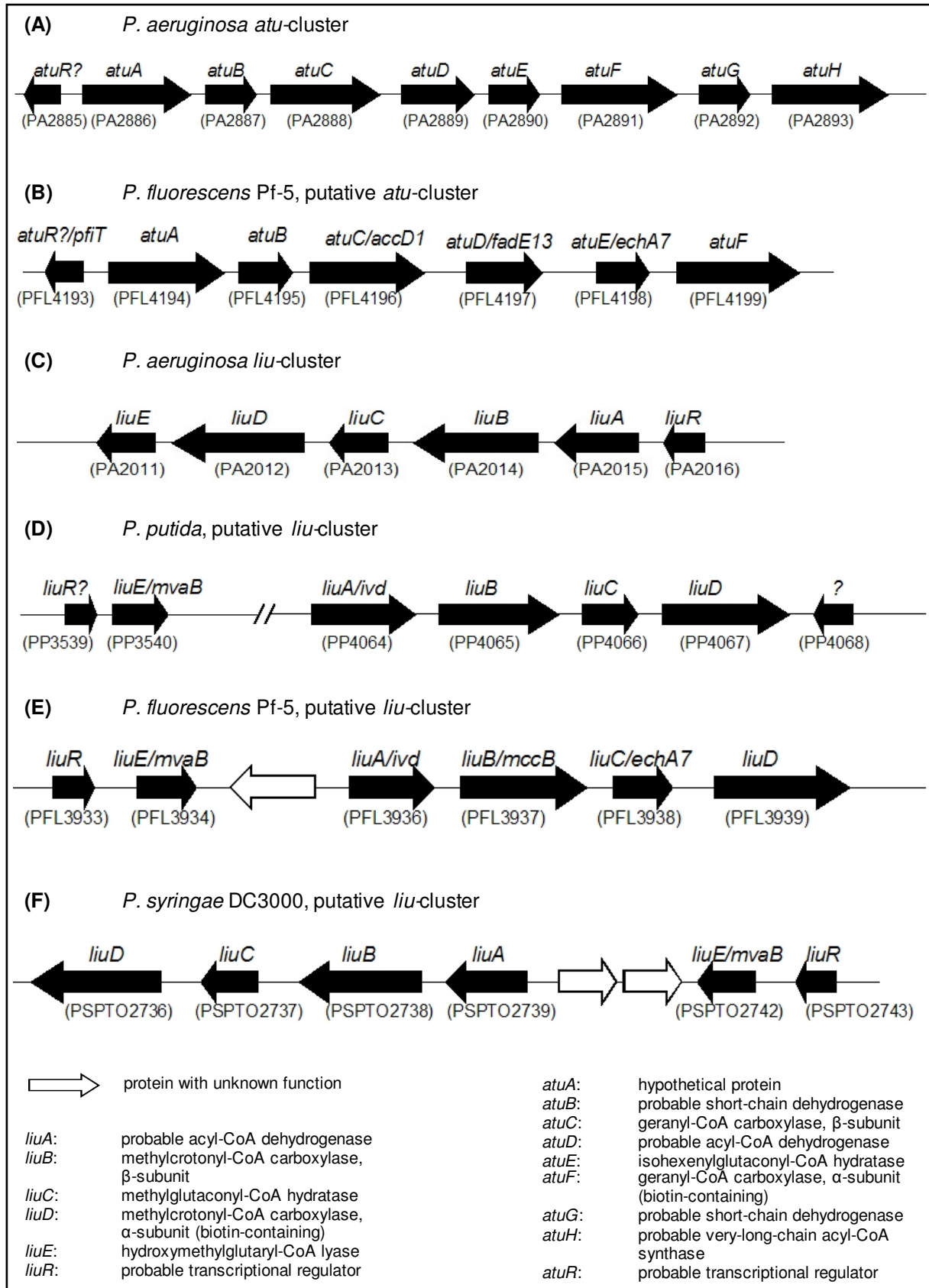


Bild 2.7: *Atu*- und *liu*-Cluster aus *P. aeruginosa* PAO1 (A und C) und *P. fluorescens* Pf-5 (B und E) sowie mögliche *liu*-Cluster von *P. putida* KT2400, und *P. syringae* DC3000 (Daten von www.pseudomonas.com und www.tigr.org) aus HÖSCHLE et al. (2005a)

Beim Vergleich der Proteinsequenz des *atu*-Clusters aus *P. aeruginosa* mit den Proteinsequenzen der Genome der oben genannten Pseudomonaden konnte im Genom von *P. fluorescens* Pf-5 überraschenderweise ein Cluster mit 6 Genen gefunden werden, dessen Genprodukte eine Aminosäureidentität von 70-91% zu den Proteinen AtuA bis AtuF (ORFs PA2886 bis PA2891) aufweisen (Bild 2.7 A und B). Die Aminosäureidentität der beiden vermeintlichen Regulatoren AtuR betrug 81,5%. Da schon gezeigt werden konnte, dass das *atu*-Cluster essentiell für den Abbau von Citronellol in *P. aeruginosa* ist, sollte nun untersucht werden, ob *P. fluorescens* Pf-5 durch dieses Cluster ebenfalls in der Lage ist, azyklische Terpene zu verwerten. Beim Wachstum von *P. fluorescens* Pf-5 auf Citronellol, Citronellal und Citronellsäure konnte kein Unterschied zum Wachstum von *P. aeruginosa* beobachtet werden. Ein deutlicher Unterschied konnte jedoch bei Wachstumsversuchen auf Geraniol, Geranial (Citral) und Geranylsäure festgestellt werden. Während *P. aeruginosa* auf diesen Kohlenstoffquellen ein gutes Wachstum zeigte, war *P. fluorescens* Pf-5 nicht in der Lage, diese Stoffe zu verwerten. Dieses Experiment zeigte, dass neben den bisher bekannten Mikroorganismen *P. aeruginosa*, *P. citronellolis* und *P. mendocina* auch *P. fluorescens* Pf-5 in der Lage ist, Citronellol als einzige Kohlenstoffquelle zu verwerten (HÖSCHLE et al., 2005a). Weiterhin konnte aus diesem Ergebnis geschlossen werden, dass die Oxidation der Alkohole zu den Säuren, wie in *P. aeruginosa* bereits gezeigt werden konnte (HÖSCHLE & JENDROSSEK, 2005), auch in *P. fluorescens* Pf-5 nicht durch dieselben Enzyme umgesetzt werden kann.

Um weiteren Aufschluss über die Beteiligung des *atu*-Clusters am Abbau von azyklischen Terpenen und des *liu*-Clusters an der Umsetzung von Leucin und Isovaleriansäure zu erhalten, sollten die Carboxylasen der beiden Cluster aus *P. aeruginosa* genauer untersucht werden.

Wie bereits aus der Literatur bekannt ist, wird die MCase beim Wachstum auf Isovaleriansäure induziert. Beim Wachstum auf Citronellsäure werden sowohl die GCCase als auch die MCase induziert (FALL & HECTOR, 1977; HECTOR & FALL, 1976a; HECTOR & FALL, 1976b). Mit Hilfe von Aktivitätstests der MCase und GCCase im Wildtyp und den beiden Carboxylasemutanten *P. aeruginosa* PAO1 Sm^r ins-*atuF* und *P. aeruginosa* PAO1 Sm^r ins-*liuD* sollte die Zuordnung der beiden Carboxylasen eindeutig gezeigt werden. Falls LiuD und AtuF tatsächlich biotinhaltigen Untereinheiten der MCase und GCCase darstellen, dürfte in der Mutante

P. aeruginosa PAO1 Sm^r ins-*liuD* keine MCCase-Aktivität und in der Mutante *P. aeruginosa* PAO1 Sm^r ins-*atuF* keine GCCase-Aktivität gemessen werden.

Zur Durchführung dieser Tests wurden Zellen der Carboxylasemutanten und des Wildtyps auf Glucose, Citronellsäure und Isovaleriansäure kultiviert. Um ein Wachstum der Mutanten sicher zu stellen, wurde den Citronellsäure- und Isovaleriansäurekulturen zusätzlich 0,1% Glucose zugeben. Die Aktivität der GCCase und MCCase wurde in löslichen Zellextrakten bestimmt (FALL, 1981; HECTOR & FALL, 1976b).

Da das Substrat der GCCase, Geranyl-CoA, nicht kommerziell zu erwerben war, wurde es mittel der gemischten Säureanhydrid-Methode aus Geranylsäure und Coenzym A synthetisiert (GUAN et al., 1999). Der Erfolg der Geranyl-CoA-Synthese wurde mittels HPLC-ESI-MS überprüft, wobei Geranyl-CoA durch das erwartete quasimolekulare Ion ([M-H]⁻) m/z 916 und das zugehörige Natrium-Addukt ([M-2H+Na]⁻) m/z 938 im Hauptpeak nachgewiesen werden konnte.

Weder die Mutanten *P. aeruginosa* PAO1 Sm^r ins-*atuF* und *P. aeruginosa* PAO1 Sm^r ins-*liuD* noch der Wildtyp zeigten eine GCCase- und MCCase-Aktivität nach der Kultivierung auf Glucose. Im Zellextrakt mit Isovaleriansäure kultivierten Wildtypzellen konnte eine MCCase-Aktivität von 21 mU/mg, jedoch keine GCCase-Aktivität gemessen werden. Mit Citronellsäure als Kohlenstoffquelle gewachsene Wildtypzellen zeigten eine GCCase-Aktivität von 2 mU/mg und eine MCCase-Aktivität von 12 mU/mg. Es konnte gezeigt werden, dass beim Wachstum auf Isovaleriansäure nur die MCCase induziert wurde, beim Wachstum auf Citronellsäure wurden sowohl die MCCase als auch die GCCase induziert. Die gemessene spezifische MCCase-Aktivität mit Isovaleriansäure gewachsener Zellen lag im Bereich der von Fall & Hector bestimmten Aktivität von 30 mU/mg in *P. citronellolis*. Die bestimmte spezifische GCCase-Aktivität war um das zehnfache geringer als die von Fall & Hector bestimmte GCCase-Aktivität in *P. citronellolis* (FALL, 1981; FALL & HECTOR, 1977). Mutante *P. aeruginosa* PAO1 Sm^r ins-*atuF* zeigte beim Wachstum auf Isovaleriansäure und Citronellsäure MCCase-Aktivitäten von 3 mU/mg und 2 mU/mg. Eine GCCase-Aktivität in Citronellsäure gewachsener Zellen konnte nicht detektiert werden, was darauf hinweist, dass die GCCase in dieser Mutante nicht funktionsfähig und somit *AtuF* eine Untereinheit der GCCase sein muss. Im löslichen Zellextrakt der Mutante *P. aeruginosa* PAO1 Sm^r ins-*liuD* konnte mit Ausnahme einer geringen MCCase-Aktivität in mit Citronellsäure als Kohlenstoffquelle gewachsenen Zellen

(1 mU/mg) keine Aktivität detektiert werden. Da diese MCase-Aktivität in mit Isovaleriansäure gewachsener Zellen nicht zu detektieren war und aus der Literatur bekannt ist, dass die GCCase eine unspezifische Aktivität gegenüber 3-Methylcrotonyl-CoA zeigt (FALL, 1981), wurde vermutlich die unspezifische GCCase-Aktivität gemessen. Da über die tatsächlich eingesetzte Menge des selbst synthetisierten Geranyl-CoA keine Aussage gemacht werden konnte und schon im Wildtyp nur eine sehr geringe GCCase-Aktivität nachzuweisen war, war denkbar, dass eine vorhandene GCCase-Aktivität in dieser Mutante nicht direkt messbar war, sie aber durch den unspezifischen Umsatz von sehr reinem 3-Methylcrotonyl-CoA nachgewiesen werden konnte. Diese Ergebnisse zeigen, dass AtuF und LiuD biotinabhängige Untereinheiten der GCCase bzw. MCase darstellen.

Um zu zeigen, dass die GCCase in Mutante *P. aeruginosa* PAO1 Sm^r ins-*liuD* tatsächlich induziert wurde, wurden lösliche Proteinextrakte von mit Glucose, Citronellsäure und Isovaleriansäure gewachsener Zellen über an eine Matrix gekoppeltes monomeres Avidin aufgereinigt, die nativen Biotinproteine im SDS-Gel aufgetrennt und anschließend einer Western Blot Analyse mit Streptavidin unterzogen. Wie Bild 2.8B zeigt, konnte wie im Wildtyp (Bild 2.8A) ein konstitutiv induziertes Protein mit einer Größe von 63 kDa nachgewiesen werden. In Citronellsäure kultivierten Zellen konnte im Gegensatz zum Wildtyp zusätzlich nur noch ein Protein mit einer Größe von 71 kDa nachgewiesen werden. Dies schien jedoch im Vergleich zum Wildtyp deutlich schlechter induziert zu werden. Das Protein mit einer Größe von 74 kDa, welches im Wildtyp sowohl in mit Citronellsäure als auch in mit Isovaleriansäure gewachsenen Zellen nachgewiesen werden konnte, konnte in Mutante *P. aeruginosa* PAO1 Sm^r ins-*liuD* weder in mit Citronellsäure induzierten noch in mit Isovaleriansäure induzierten Zellen detektiert werden (HÖSCHLE et al., 2005a).

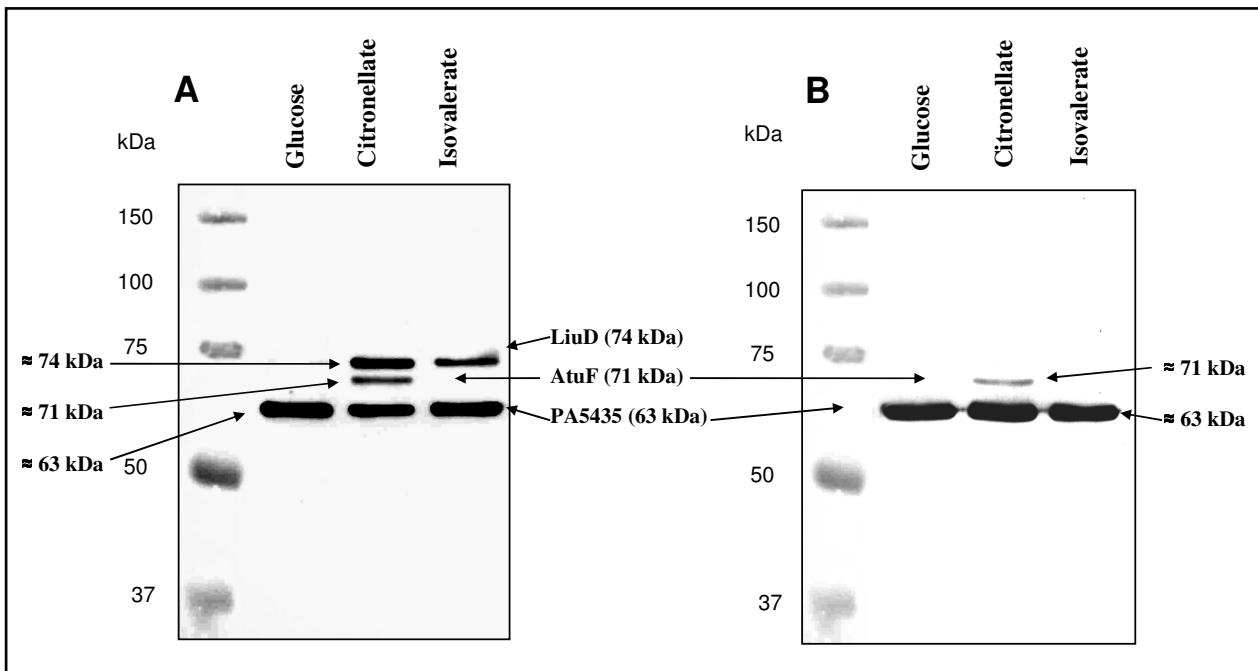


Bild 2.8: Western Blot Analyse biotinhaltiger Proteine in Avidin-gereinigtem Rohextrakt der Insertionsmutante *P. aeruginosa* PAO1 *Sm^f ins liuD*. Wachstum auf Glucose (0,5%), Glucose (0,1%) mit Citronellsäure (0,2%) und Glucose (0,1%) mit Isovaleriansäure (0,2%). Proteine mit einem MW kleiner als ~ 25 kDa sind aus dem Gel ausgelaufen; aus HÖSCHLE et al. (2005a)

Nach einer Trypsin-Fingerprint-Analyse und anschließender Aminosäuresequenzierung aller Proteine (durchgeführt von Dr. V. Gnau, Universität Tübingen) konnte das biotinhaltige 63 kDa-Protein als Genprodukt von ORF PA5435 identifiziert werden. Das 71 kDa-Biotinprotein konnte eindeutig AtuF zugeordnet werden. Die biotinfreien Polypeptide konnten als AtuC (58 kDa) und als Genprodukt von ORF PA5436 (48 kDa) identifiziert werden. Da in mit Isovaleriansäure gewachsenen Zellen dieser Mutante keine MCCase-Aktivität und LiuD im Western Blot nicht detektiert werden konnte, konnte gezeigt werden, dass LiuD die biotinhaltige und LiuB die biotinfreie Untereinheit der MCCase darstellen muss. Die in den mit Citronellsäure gewachsenen Zellen gemessene geringe MCCase-Aktivität kann somit nicht von einer funktionsfähigen MCCase stammen, sondern ist die unspezifische Aktivität der GCCase gegenüber dem Substrat 3-Methylcrotonyl-CoA.

In Mutante *P. aeruginosa* PAO1 *Sm^f ins-atuF* konnte keine GCCase-Aktivität festgestellt und AtuF im Western Blot (Bild 2.6) nicht detektiert werden. Somit konnte gezeigt werden, dass AtuF als biotinhaltige und AtuC als biotinfreie Untereinheit die GCCase bilden und folgendes Abbauschema für den Abbau von Citronellol und Geraniol in *P. aeruginosa* angenommen werden kann.

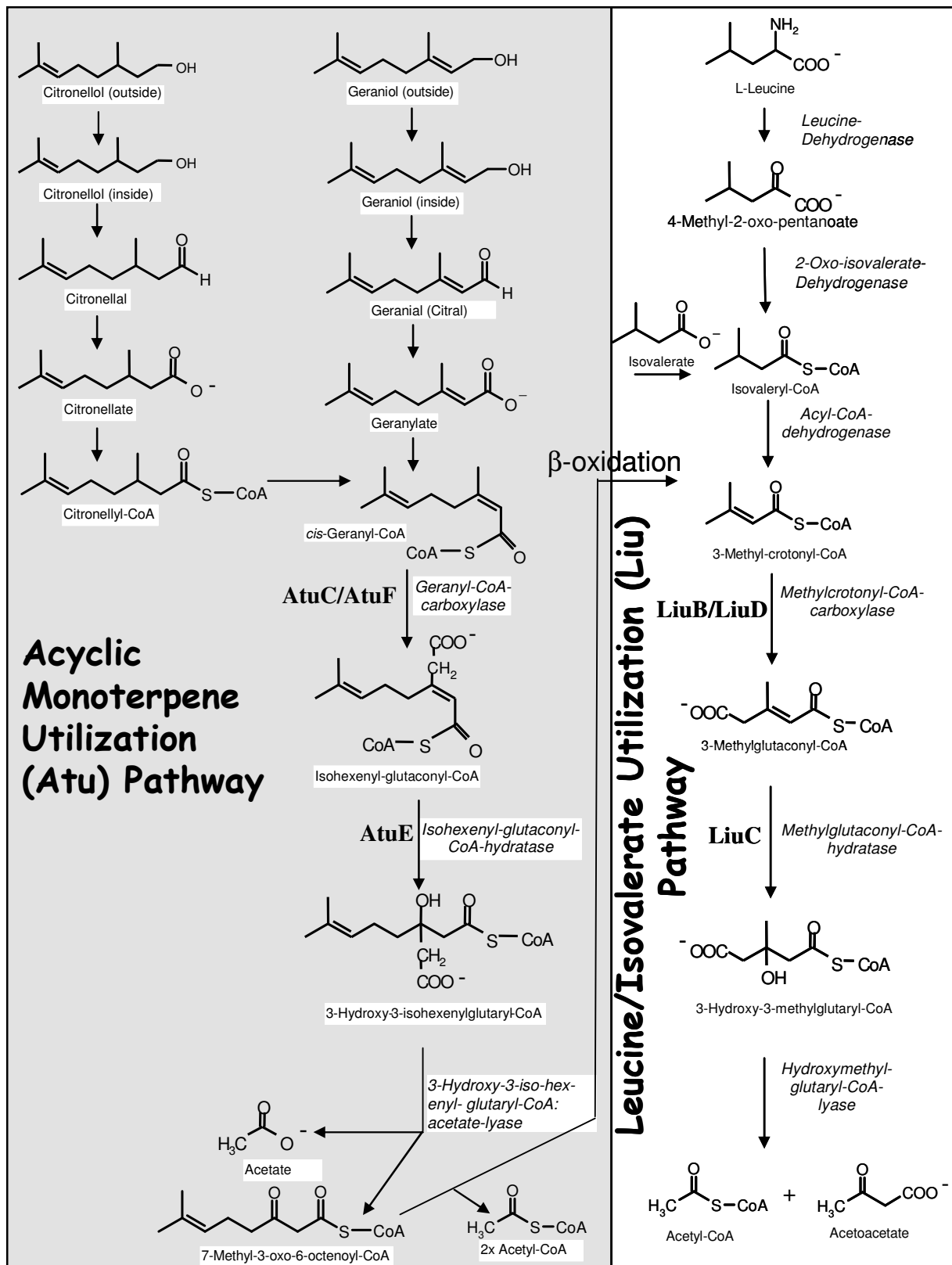


Bild 2.9: Möglicher Atu- und Liu-Abbauweg nach SEUBERT & FASS (1964b) aus HÖSCHLE et al. (2005b). Identifizierte Genprodukte sind bereits im Schema integriert.

Ebenso konnte gezeigt werden, dass *AtuE*, die vermutete Isohexenylglutaconyl-CoA-Hydratase, neben *AtuF* ebenfalls essentiell für den Abbau von linearen Terpenen ist, da die Mutante #22B/1/1 denselben Phänotyp aufweist wie *P. aeruginosa* PAO1 Sm^r ins-*atuF*. Da *atuE* und *atuF* innerhalb eines Clusters mit 8 Genen liegen, die die gleiche Transkriptionsrichtung aufweisen, bilden sie vermutlich eine Transkriptionseinheit und können als *atu*-Cluster (*atuABCDEFGH*) bezeichnet werden. Vermutlich ist das Wachstum von Mutanten mit Defekten im *atu*-Cluster auf Leucin und Isovaleriansäure nicht beeinflusst, so dass gesagt werden kann, dass der Leucinabbau in diesen Mutanten voll funktionsfähig ist. *LiuC*, die vermeintliche Methylglutaconyl-CoA-Hydratase, ist wie *LiuD* essentiell für den Abbau von Leucin und Isovaleriansäure aber auch für den Abbau azyklischer Terpene, wie die Wachstumsversuche zeigten. Auch durch die hohe Ähnlichkeit zu Genclustern anderer Pseudomonaden, die keine Terpene verwerten können, ist es sehr unwahrscheinlich, dass das von Diaz-Perez beschriebene *liu*-Cluster (vormals *gny*-Cluster) (DIAZ-PEREZ et al., 2004) die Gene für die Umsetzung von Citronellol und Geraniol bis zur Stufe von 7-Methyl-3-oxo-6-octenoyl-CoA beschreiben.

2.5 Klonierung des *atu*-Clusters aus *P. aeruginosa* PAO1

Da bisher sehr wenige Mikroorganismen bekannt sind, die die Fähigkeit besitzen, azyklische Terpene zu verwerten, sollte das *atu*-Cluster aus *P. aeruginosa* PAO1 kloniert und in weitere Pseudomonaden übertragen werden, um diese Fähigkeit in den Stämmen *P. oleovorans*, *P. putida* und *P. fluorescens* GK13 zu etablieren.

Für die Klonierung eines so großen Fragmentes (12236 bp; PA2885-PA2893) aus einem Gemisch von unterschiedlichen Fragmenten wurde die Herstellung einer Cosmidgenbank gewählt. Bei dieser Methode wird die genomische DNA partiell mit einem Restriktionsenzym verdaut, die Fragmente mit einem Cosmid zu konkatemerer DNA ligiert und diese mit einem Phagenextrakt verpackt. Die verpackte DNA wird anschließend in *E. coli* injiziert, in dem sich das Cosmid wie ein Plasmid verhält.

Für den partiellen Verdau der genomischen DNA wurde *Bam*HI ausgewählt, da zum einen das verwendete Cosmid SuperCos-1 (Stratagene; freundlicherweise von Herrn Altenbuchner überlassen) für die Klonierung eine *Bam*HI-Schnittstelle besitzt.

Zum anderen befindet sich nur eine *Bam*HI-Schnittstelle innerhalb des möglichen Operons, was dazu führt, dass sich das gesamte Operon bei einem partiellen Verdau auf einem 23,454 kbp großen *Bam*HI-Fragment (11,0 kbp und 12,454 kbp) befinden würde. Für die Verpackung der Cosmide wurde einerseits der Verpackungs-Kit „pWEB cosmid cloning kit“ der Firma EPICENTRE verwendet, andererseits wurden Verpackungsextrakte aus den Stämmen *E. coli* BHB2688 und *E. coli* BHB2690 hergestellt. Um die Verpackungseffizienz der beiden Extrakte zu vergleichen, wurde konkatemere λ -DNA verpackt und in den Stamm *E. coli* LE392 transduziert. Hierbei ergab sich für den selbst hergestellten Phagenextrakt eine Verpackungseffizienz von $3,1 \times 10^6$ pfu/ μ g DNA, für den Phagenextrakt aus dem Klonierungs-Kit eine Effizienz von $4,15 \times 10^8$ pfu/ μ g DNA. Auf Grund der höheren Verpackungseffizienz wurde der Verpackungsextrakt aus dem Klonierungs-Kit verwendet. Die Transduktion wurde mit dem Stamm *E. coli* EPI100-T1^R nach Anleitung des Kits durchgeführt. Von 3000 gepickten Klone zeigten 15 Klone ein positives Signal bei der DNA-DNA-Hybridisierung mit einer DIG-markierten Sonde spezifisch für den ORF PA2893 (*atuH*). Nach einem Kontrollverdau mit *Bam*HI konnte in allen Plasmiden ein 12,454 kbp-Fragment nachgewiesen werden. Von diesen 15 Klonen zeigten 2 Klone ein positives Signal bei der DNA-DNA-Hybridisierung mit einer DIG-markierten Sonde spezifisch für den ORF PA2885, während im Kontrollverdau ein 11 kbp-Fragment nachgewiesen werden konnte. Weiterhin konnte das Clusterfragment mit einem *Dra*I/*Mfe*I-Doppelveidau aus dem Cosmid isoliert werden, was zeigte, dass das Operon in Form von zwei in der richtigen Reihenfolge klonierten *Bam*HI-Fragmenten entstanden ist. Dieses *Dra*I/*Mfe*I-Fragment wurde anschließend in den Vektor pBBR1MCS-5 kloniert und über Konjugation in die Stämme *P. oleovorans*, *P. putida*, *P. fluorescens* GK13 sowie die PAO1-Mutante #22B/1/1 übertragen. Wachstumsversuche auf Citronellol, Geraniol, Citronellsäure und Geranylensäure zeigten, dass die Fähigkeit, azyklische Terpene zu verwerten, nicht alleine durch die Übertragung dieses Cluster erworben werden kann, denn die rekombinanten Stämme von *P. oleovorans*, *P. putida* und *P. fluorescens* GK13 zeigten wie ihr Wildtyp kein Wachstum auf diesen Kohlenstoffquellen. In Mutante #22B/1/1, die kein Wachstum auf den linearen Terpenen zeigte, konnte durch Übertragung des Operons der Phänotyp des PAO1-Wildtyps wieder hergestellt werden. Dieser Versuch zeigte deutlich, dass der Abbau von linearen Terpenen nicht durch die Übertragung eines einzelnen Operons in anderen Stämmen etabliert werden

kann. Folglich sind nicht nur das *atu*-Cluster und ein funktionsfähiger Leucinabbauweg für den Abbau linearer Terpene nötig, sondern es spielen noch andere Faktoren direkt oder indirekt eine wichtige Rolle.

2.6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten Gene, die am Abbau von azyklischen Terpenen beteiligt sind, identifiziert werden. Hierzu gehören *AtuF/AtuC* und *LiuD/LiuB* (ORFs PA2891/PA2888 und PA2012/PA2014), die über ihre Funktionen der Geranyl-CoA-Carboxylase bzw. der Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase zugeordnet werden können (HÖSCHLE et al., 2005b; HÖSCHLE et al., 2005a). Aber auch *atuE* und *liuC* konnten als essentielle Gene beim Abbau azyklischer Terpene identifiziert werden. Da die Genprodukte bereits in der Pseudomonas-Datenbank als vermeintliche Enoyl-CoA-Hydratasen beschrieben sind und weitere Internetrecherchen dieses Ergebnis bestätigten, codieren sie vermutlich die Isohexenylglutaconyl-CoA-Hydratase (*atuE*) bzw. die Methylglutaconyl-CoA-Hydratase (*liuC*). *LiuE* zeigt eine hohe Ähnlichkeit zu bereits identifizierten Hydroxymethylglutaryl-CoA-Lyasen (*P. putida* KT2440, *P. fluorescens* Pf-5 und *P. syringae* DC3000) und wird daher als Hydroxymethylglutaryl-CoA-Lyase postuliert. Da *LiuA* eine Aminosäureidentität von 87% zur Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase aus *P. putida* KT2440 und *P. fluorescens* Pf-5 zeigt, wird *LiuA* diesem Enzym in *P. aeruginosa* zugeordnet. Betrachtet man beide Gencluster, so stellt man fest, dass jedem Enzym des Abbauwegs durch die vorhergesagte Funktion ein Protein zugeordnet werden kann. Jedoch ist kein Gen vorhanden, dessen Genprodukt die Funktion der 3-Hydroxy-3-isohexenylglutaryl-CoA:Acetat-Lyase zugeordnet wurde. Bisher sind auch noch keine Hinweise bekannt, dass PA2886, dessen Genprodukt als „hypothetical protein“ beschrieben ist, für diese Lyase codiert. Eine Mutante von *P. aeruginosa* mit einer Deletion im ORF PA2886 zeigte kein Wachstum auf Citronellol, Geraniol und Geranolsäure. Das Wachstum auf Citronellsäure war im Vergleich zum Wildtyp nur leicht eingeschränkt (FÖRSTER-FROMME, 2005). Da man bei einer Mutation in der Lyase ein auf allen vier Kohlenstoffquellen negativer Phänotyp erwarten würde, ist es eher unwahrscheinlich, dass PA2886 für die Lyase kodiert. Alle bisherigen Mutationen innerhalb des *atu*-Clusters führten zu einem Geraniol- und Geranolsäure-

negativen Phänotyp. Das Wachstum dieser Mutanten auf Citronellol und Citronellsäure war entweder gehemmt oder nicht beeinflusst (siehe Phänotyp der Mutante mit Deletion in ORF PA2886). Da sich der Abbau von Citronellol und Geraniol auf der Stufe von Geranyl-CoA vereinigt, liegt die Vermutung sehr nahe, dass dieses Cluster Gene für die Umsetzung von Citronellol über Citronellsäure zu Geranyl-CoA sowie dessen weiteren Abbau zu 7-Methyl-3-oxo-6-octenoyl-CoA enthält. Die Tatsache, dass die Oxidation von Geraniol zur Geranylsäure mindestens einen molybdänabhängigen Schritt beinhaltet (Geranialdehydrogenase) (HÖSCHLE & JENDROSSEK, 2005) und keine Anhaltspunkte gegeben sind, dass die im Cluster vermeintlichen Dehydrogenasen einen Molybdäncofaktor benötigen, stützt diese Annahme ebenfalls. Vermutlich sind die Gene für die Oxidation von Geraniol zur Geranylsäure und die weitere Umsetzung zu Geranyl-CoA an einer anderen, noch nicht entdeckten, Stelle des Genoms lokalisiert. Damit könnte auch das etwas schlechtere Wachstum auf Geraniol und Geranylsäure von *P. aeruginosa* im Vergleich zum Wachstum auf Citronellol und Citronellsäure erklärt werden. Für die Vermutung, dass das *atu*-Cluster nur Gene für die Umsetzung von Citronellol enthält, spricht auch die Tatsache, dass der Stamm *P. fluorescens* Pf-5, der ebenfalls ein vermeintliches *atu*-Cluster enthält, nur Citronellol, Citronellal und Citronellsäure verwerten kann, jedoch kein Wachstum auf Geraniol, Geranial und Geranylsäure zeigt (HÖSCHLE et al., 2005a). Das Cluster in *P. fluorescens* Pf-5 besitzt wie das *atu*-Cluster in *P. aeruginosa* PAO1 acht Gene. Die Genprodukte der ersten sechs Gene dieses Clusters zeigen hohe Ähnlichkeiten zu AtuA bis AtuF (70-91% Aminosäureidentität) aus *P. aeruginosa*. Die beiden letzten Gene sind aufgrund ihrer Orientierung dem Cluster zuzuordnen, die zugehörigen Genprodukte können aber aufgrund der sehr geringen Ähnlichkeit auf Aminosäureebene nicht als AtuG und AtuH bezeichnet werden. Daher kann vermutet werden, dass AtuG und AtuH, die in *P. fluorescens* Pf-5 nicht enthalten sind, nicht an der Umsetzung von Citronellol und Citronellsäure beteiligt sind. AtuG ist in der Datenbank als vermeintliche „short chain dehydrogenase“ beschrieben. Vergleiche der Aminosäuresequenz mit der Sequenz anderer Proteine zeigen, dass hohe Ähnlichkeiten zu anderen Dehydrogenasen bestehen, die keine bestimmte Substratspezifität aufweisen. AtuH zeigt hohe Ähnlichkeiten zu anderen, meistens AMP-bindenden, Acyl-CoA-Synthetasen. Da keine Mutanten mit Defekten in diesen beiden Genprodukten vorliegen, kann keine Aussage gemacht werden, ob diese beiden Proteine eventuell an der Oxidation von

Geraniol zur Geranolsäure und dessen Aktivierung beteiligt sind. Das Genprodukt von *atuB* ist als vermeintliche „short chain dehydrogenase“ beschrieben und zeigt hohe Ähnlichkeiten zu anderen „short chain dehydrogenases“. Da die Genprodukte der Gene innerhalb des *atu*-Clusters für die Umsetzung von Citronellol über Citronellsäure zu Geranyl-CoA und dessen weitere Metabolisierung zuständig sind und die Oxidation des Alkohols zur Säure zwei Dehydrogenaseschritte beinhaltet, liegt die Vermutung nahe, dass *AtuB* einen oder vielleicht sogar beide Schritte katalysiert. *AtuD* ist in der Pseudomonas-Datenbank als vermeintliche Acyl-CoA-Dehydrogenase beschrieben. Vergleiche der Aminosäuresequenz mit den Sequenzen der Proteindatenbank ergaben hohe Ähnlichkeiten zu anderen Acyl-CoA-Dehydrogenasen. Eine Acyl-CoA-Dehydrogenase wird bei der Reduktion von Citronellyl-CoA zu Geranyl-CoA und in der β -Oxidation benötigt. Da die β -Oxidation sehr wahrscheinlich über dieselben Enzyme ablaufen wird wie der Abbau anderer Fettsäuren, kann vermutet werden, dass das Genprodukt von *atuD* an der Bildung von Geranyl-CoA aus Citronellyl-CoA beteiligt ist. Alle diese Hinweise zeigen, dass die Synthase, die zur Bildung von Citronellyl-CoA aus Citronellsäure notwendig ist, im *atu*-Cluster nicht vorhanden zu sein scheint. Das Genprodukt von *atuH*, welches in der Pseudomonas-Datenbank als vermeintliche Synthase beschrieben ist, könnte diese Funktion übernehmen. Da dieses Gen in *P. fluorescens* Pf-5 nicht vorhanden ist, dieser aber Citronellol als einzige Kohlenstoffquelle verwerten kann, ist diese Wahrscheinlichkeit jedoch sehr gering. In Bild 3.1 ist der mögliche *Atu*- und *Li*-Abbauweg von Citronellol mit den Interpretationen dargestellt.

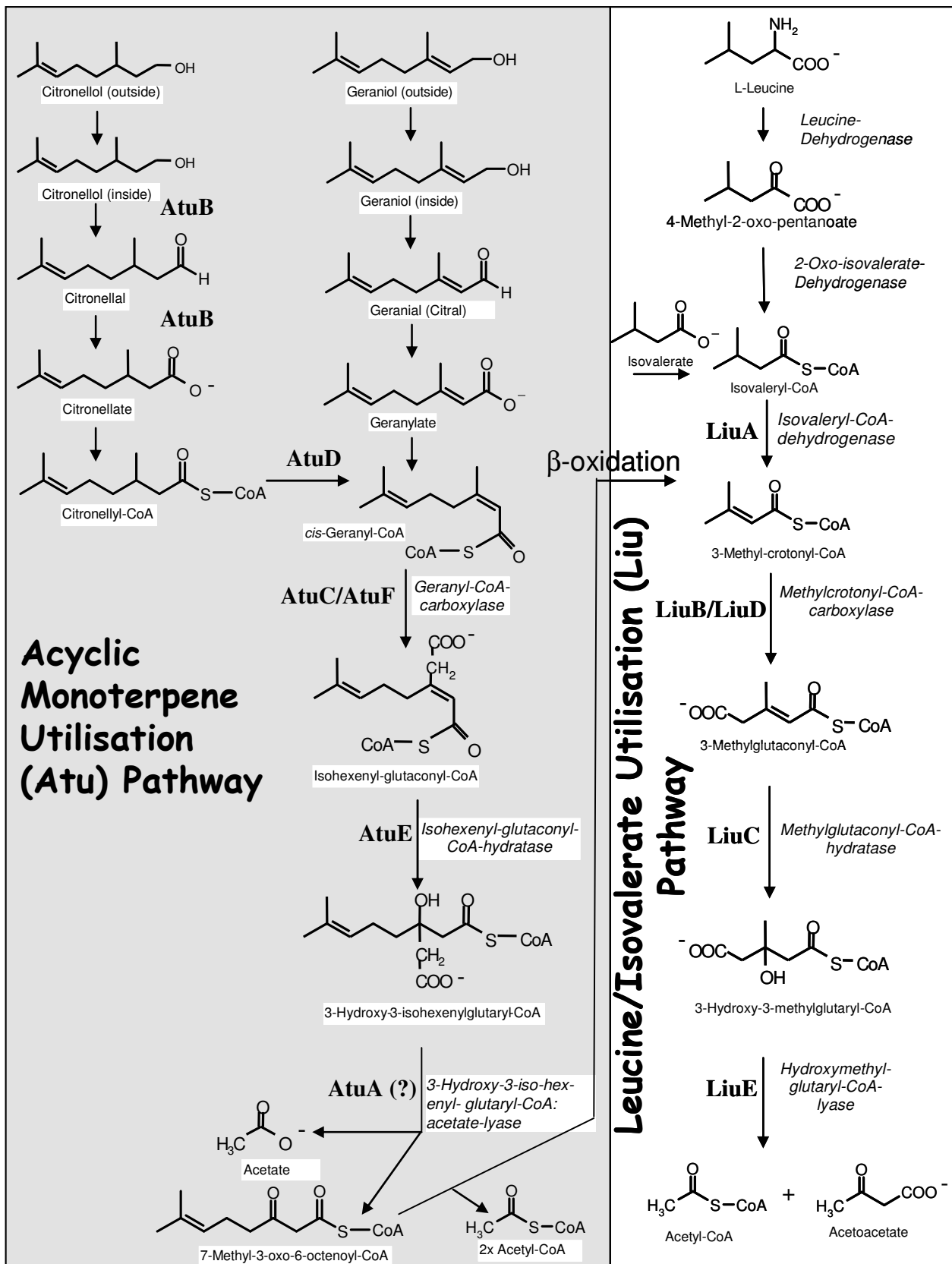


Bild 3.1: Möglicher Atu- und Liu-Abbauweg nach SEUBERT & FASS (1964b) mit eingetragenen Interpretationen der Genprodukte des *atu*- und *liu*-Clusters, verändert aus HÖSCHLE et al. (2005a). Mit (?) markiertes Protein ist weder durch den Phänotyp noch durch Vergleiche der Aminosäuresequenz nachgewiesen.

Interessant bleibt auch die Frage, wie die Phänotypen der weiteren, in dieser Arbeit nicht näher untersuchten, Transposonmutanten (Tabelle 2.2) erklärt werden können. Die Nähe der Transposoninsertionsorte von Mutanten mit Geraniol-negativem Phänotyp zu Genen, die an der Moco-Synthese beteiligt sind, war sehr auffällig. Entweder wurde dieser Phänotyp durch polare Effekte des Transposons auf die Gene der Moco-Biosynthese hervorgerufen (zum Beispiel bei der Mutation im intergenischen Bereich zwischen ORF PA3032 und PA3033) oder die von der Mutation betroffenen Gene sind selbst am Abbau der Terpene direkt oder indirekt beteiligt. Fraglich bleibt auch, warum die Mutation im Zweikomponentensensor CbrA (ORF PA4725), der für die Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels verantwortlich ist, nur das Wachstum auf Geraniol beeinflusst während das Wachstum auf anderen Kohlenstoffquellen aber unbeeinflusst bleibt. Eventuell spielen auch hier polare Effekte auf bisher unbekannte Gene, die an der Umsetzung von Geraniol zur Geranolsäure beteiligt sind und sich in unmittelbarer Nachbarschaft zum ORF PA4725 befinden, eine Rolle. Eine Mutation im ORF PA1617, dessen Genprodukt als vermeintliches AMP-bindendes Enzym beschrieben ist, bewirkt, dass kein Wachstum auf Citronellol, Geraniol, Citronellsäure und Geranolsäure stattfinden kann. Dieser Phänotyp deutet bereits darauf hin, dass dieses Gen essentiell für den Abbau von Terpenen sein muss. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz mit der Sequenz anderer Proteine zeigte, dass signifikante Ähnlichkeiten zu vermeintlichen Synthasen vorhanden sind. Da sowohl für die Aktivierung der Citronellsäure als auch für die Aktivierung der Geranolsäure eine Synthase benötigt wird und diese aus den oben bereits genannten Gründen im *atu*-Cluster sehr wahrscheinlich nicht vorhanden ist, liegt die Vermutung nahe, dass das Genprodukt von ORF PA1617 eine dieser beiden Synthasen darstellt. Das Genprodukt von ORF PA 1617 zeigt eine hohe Ähnlichkeit (71% Aminosäureidentität) zum Genprodukt von ORF PFL1744 (AMP-bindendes Protein, FadD-2) aus *P. fluorescens* Pf-5. Man könnte nun annehmen, dass das Genprodukt von ORF PA1617 aus PAO1 und das Genprodukt von ORF PFL1744 aus *P. fluorescens* Pf-5 die jeweilige Synthase für die Aktivierung der Citronellsäure darstellt. Da eine Mutation im ORF PA1617 von *P. aeruginosa* zu einem Citronellol-, Citronellsäure-, Geraniol- und Geranolsäure-negativen Phänotyp führt, müsste dieses Genprodukt auch für die Aktivierung der Geranolsäure in PAO1 zuständig sein. Um dies eindeutig zu klären, müssen noch weitere Untersuchungen in *P. aeruginosa* PAO1 und *P. fluorescens* Pf-5 durchgeführt werden. Eine Mutation im

ORF PA1580, dessen Genprodukt die Citratsynthase GltA darstellt, führte zu einem schwachen Wachstum auf Geraniol und Citronellsäure. Das Wachstum dieser Mutante auf Citronellol und Geranylsäure im Vergleich zum Wildtyp war nicht beeinflusst. Die Citratsynthase ist ein essenzielles Enzym des Tricarbonsäurezyklus. Wie aus der Literatur bereits bekannt ist, wird das beim Abbau von Terpenen entstehende Acetyl-CoA über den Glyoxylatzyklus in den Stoffwechsel eingeschleust (FÖRSTER-FROMME & JENDROSSEK, 2005). Ist die Citratsynthase defekt, kann Acetyl-CoA nicht weiter umgesetzt werden und es müsste ein auf allen vier Kohlenstoffquellen negativer Phänotyp auftreten. Der beobachtete Phänotyp lässt sich nur so erklären, dass ein Isoenzym der Citratsynthase in *P. aeruginosa* vorhanden sein muss, welches diese Reaktion katalysiert.

Weitere Proteine aus *P. aeruginosa*, die am Abbau von Citronellol und Geraniol direkt oder indirekt beteiligt sind, sollen in einer weiteren Arbeit durch 2D-Gelelektrophorese mit anschließender Trypsin-Fingerprint-Analyse und Aminosäuresequenzierung ermittelt werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Oxidation von Geraniol zur Geranylsäure in *P. citronellolis* und *P. mendocina* nicht wie in *P. aeruginosa* durch die Zugabe von Wolframat ins Medium gehemmt werden konnte (HÖSCHLE & JENDROSSEK, 2005). Es muss folglich geklärt werden, ob diese beiden Stämme zusätzlich molybdänunabhängige Isoenzyme für die Oxidation von Geraniol zur Geranylsäure besitzen oder ob die Umsetzung des Alkohols in die Säure durch andere, molybdänunabhängige Enzyme katalysiert wird. Es scheint sehr wahrscheinlich zu sein, dass Gene für die Oxidation von Geraniol zur Geranylsäure in *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* und *P. citronellolis* unabhängig von einem *atu*-Cluster vorhanden sind, da auch in *P. citronellolis* das *atu*-Cluster nachgewiesen werden konnte (FÖRSTER-FROMME, 2005) und in allen drei Stämmen die Oxidation von Geraniol zur Geranylsäure unterschiedlich bzw. gar nicht (*P. fluorescens* Pf-5) abläuft.

3 Literatur

Burke, Y. D., Ayoubi, A. S., Werner, S. R., McFarland, B. C., Heilman, 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**, 3127-3134.

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**, 151-156.

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.

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

Carneseccchi, S., Bras-Goncalves, 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**, 53-59.

Carneseccchi, S., Langley, K., Exinger, F., Gosse, F. & Raul, F. (2002b). Geraniol, a component of plant essential oils, sensitizes human colon cancer cells to 5-fluorouracil treatment. *IARC Sci Publ* **156**, 407-409.

de Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U. & 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.

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**, 5102-5110.

- 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**, 1739-1747.
- Fall, R. R. (1981).** 3-Methylcrotonyl-CoA and geranyl-CoA carboxylases from *Pseudomonas citronellolis*. *Methods Enzymol* **71 Pt C**, 791-799.
- Fall, R. R., Brown, J. L. & Schaeffer, T. L. (1979).** Enzyme recruitment allows the biodegradation of recalcitrant branched hydrocarbons by *Pseudomonas citronellolis*. *Appl Environ Microbiol* **38**, 715-722.
- Fall, R. R. & Hector, M. L. (1977).** Acyl-coenzyme A carboxylases. Homologous 3-methylcrotonyl-CoA and geranyl-CoA carboxylases from *Pseudomonas citronellolis*. *Biochemistry* **16**, 4000-4005.
- Förster-Fromme, K. (2005).** Personal communication.
- 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.
- Guan, X., Diez, T., Prasad, T. K., Nikolau, B. J. & Wurtele, E. S. (1999).** Geranyl-CoA carboxylase: a novel biotin-containing enzyme in plants. *Arch Biochem Biophys* **362**, 12-21.
- Hector, M. L. & Fall, R. R. (1976a).** Evidence for distinct 3-methylcrotonyl-CoA and geranyl-CoA carboxylases in *Pseudomonas citronellolis*. *Biochem Biophys Res Commun* **71**, 746-753.
- Hector, M. L. & Fall, R. R. (1976b).** Multiple acyl-coenzyme A carboxylases in *Pseudomonas citronellolis*. *Biochemistry* **15**, 3465-3472.
- Hierro, I., Valero, A., Perez, P., Gonzalez, P., Cabo, M. M., Montilla, M. P. & Navarro, M. C. (2004).** Action of different monoterpenic compounds against *Anisakis simplex* s.l. L3 larvae. *Phytomedicine* **11**, 77-82.
- Hille, R. (1999).** Molybdenum enzymes. *Essays Biochem* **34**, 125-137.

- Höschle, B. (2002).** Identifizierung der Gene für den Citronellol-Abbau in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Diplomarbeit, Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart.
- Höschle, B., Armbruster, W. & Jendrossek, D. (2005a).** The *Pseudomonas aeruginosa* gene clusters *atuABCDEFGH* and *liuRA/liuBCDE* encode proteins of the acyclic terpene utilisation pathway (Atu) and of the leucine/isovalerate utilisation (Liu) pathway, respectively. Submitted to Microbiology.
- Höschle, B., Gnau, V. & Jendrossek, D. (2005b).** 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**, 3649-3656.
- 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.
- Irani, V. R., Darzins, A. & Rowe, J. J. (1997).** *Snr*, new genetic loci common to the nitrate reduction systems of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Curr Microbiol **35**, 9-13.
- 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**, 519-522.
- Johnson, J. L., Chaudhury, M. & Rajagopalan, K. V. (1991).** Identification of a molybdopterin-containing molybdenum cofactor in xanthine dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. Biofactors **3**, 103-107.
- Joshi, M. S. & Rajagopalan, K. V. (1994).** Specific incorporation of molybdopterin in xanthine dehydrogenase of *Pseudomonas aeruginosa*. Arch Biochem Biophys **308**, 331-334.
- Kerschen, E. J., Irani, V. R., Hassett, D. J. & Rowe, J. J. (2001).** *snr-1* gene is required for nitrate reduction in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. J Bacteriol **183**, 2125-2131.

Kull, U. (1993). Grundriss der allgemeinen Botanik. Stuttgart, Jena, New York: Gustav-Fischer-Verlag.

Leimkühler, S., Angermüller, S., Schwarz, G., Mendel, R. R. & Klipp, W. (1999). Activity of the molybdopterin-containing xanthin dehydrogenase of *Rhodobacter capsulatus* can be restored by high molybdenum concentrations in a *moeA* mutant defective in molybdenum cofactor biosynthesis. *J Bacteriol* **181**, 5930-5939.

Lengeler, J. W., Drews, G. & Schlegel, H. G. (1999). Biology of the Prokaryotes. Stuttgart: Thieme-Verlag.

Moura, J. J., Brondino, C. D., Trincao, J. & Romao, M. J. (2004). Mo and W bis-MGD enzymes: nitrate reductases and formate dehydrogenases. *J Biol Inorg Chem* **9**, 791-799.

Nichols, J. & Rajagopalan, K. V. (2002). *Escherichia coli* MoeA and MogA. Function in metal incorporation step of molybdenum cofactor biosynthesis. *J Biol Chem* **277**, 24995-25000.

Nichols, J. D. & Rajagopalan, K. V. (2005). In vitro molybdenum ligation to molybdopterin using purified components. *J Biol Chem* **280**, 7817-7822.

Pawar, P. V., Sharma, R. N., Phadnis, A. P., Nanda, B. & Patwardhan, S. A. (1991). Action of some insect growth regulators on mosquito vectors: Part I- Citronellol based diethers. *J Commun Dis* **23**, 118-122.

Rice, P. J. & Coats, J. R. (1994). Insecticidal properties of several monoterpenoids to the house fly (*Diptera: Muscidae*), red flour beetle (*Coleoptera: Tenebrionidae*), and southern corn rootworm (*Coleoptera: Chrysomelidae*). *J Econ Entomol* **87**, 1172-1179.

Schäfer, R. (2003). Isolierung und Charakterisierung Transposon-induzierter Mutanten von *Pseudomonas aeruginosa* mit Defekten in der Citronellolverwertung. Studienarbeit, Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart.

Schaeffer, T. L., Cantwell, S. G., Brown, J. L., Watt, D. S. & Fall, R. R. (1979). Microbial growth on hydrocarbons: terminal branching inhibits biodegradation. *Appl Environ Microbiol* **38**, 742-746.

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.

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. *Biochem Z* **341**, 23-34.

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

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

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

Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S. & others (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, 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**, 201-205.

Wuebbens, M. M. & Rajagopalan, K. V. (2003). Mechanistic and mutational studies of *Escherichia coli* molybdopterin synthase clarify the final step of molybdopterin biosynthesis. *J Biol Chem* **278**, 14523-14532.

Appendix 1

Microbiology (2005), 151, 2277–2283

DOI 10.1099/mic.0.27957-0

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

Received 9 February 2005
Revised 15 April 2005
Accepted 18 April 2005

Utilization of geraniol is dependent on molybdenum in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for different metabolic routes for oxidation of geraniol and citronellol

Birgit Höschle and Dieter Jendrossek

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

Mini-Tn5-induced mutants with defects in utilization of linear terpenes such as citronellol, geraniol, citronellate and/or geranylate were isolated from *Pseudomonas aeruginosa*. One mutant was unable to utilize geraniol but showed wild-type growth with the three other acyclic terpenes tested. The Tn5 insertion site of the mutant was determined by DNA sequencing. Comparison with the *P. aeruginosa* genome sequence revealed that PA3028, an ORF with high similarity on the amino acid level to molybdenum cofactor biosynthesis protein A2 (encoded by *moeA2*), was the target of mini-Tn5 in the mutant. Disruption of *moeA2* in *P. aeruginosa* PAO1 wild-type by insertion mutagenesis resulted in the same geraniol-minus phenotype. The ability to utilize geraniol was restored to the mutant by conjugative transfer of PCR-cloned wild-type *moeA2* on a broad-host-range plasmid. Growth of *P. aeruginosa* PAO1 on geraniol and geranial, but not on citronellol, citronellate or geranylate, was inhibited by the presence of 10 mM tungstate, a molybdenum-specific inhibitor. Inhibition by tungstate was prevented by addition of molybdate. The results indicate that at least one step in the oxidation of geraniol to geranic acid (geranial oxidation) is a molybdenum-dependent reaction in *P. aeruginosa* and is different from the molybdenum-independent oxidation of citronellol to citronellate.

INTRODUCTION

Terpenes are widespread compounds in nature and frequently appear in the form of aroma compounds such as citronellol (linear terpene) and camphor (aromatic terpene). Terpenes consist of two isoprene units (monoterpenes) and frequently are functionalized at one end of the molecule. Terpenes represent one of several subgroups of natural compounds harbouring methyl-branched molecular structures derived from isoprene. Examples of other subgroups are carotenoids, steroids and polyisoprene (rubber). Citronellol (3,7-dimethyl-6-octen-1-ol) is a model compound for linear monoterpenes 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 the perfume industry (odour). Moreover, citronellol is one of very few naturally occurring insect (mosquito) repellents and is a component of commercially available anti-insect outdoor candles. Geraniol is structurally related to citronellol and differs from the latter only by the presence of an additional double bond (Fig. 1). Geraniol causes the typical flavour of plants belonging to the genus *Geranium*.

Utilization of linear terpenes as a carbon source by microorganisms was first studied in the early 1960s by Seubert and coworkers (Seubert & Fass, 1964b). Seubert isolated *Pseudomonas citronellolis* by its ability to utilize citronellol and related compounds as the sole source of carbon and energy (Seubert, 1960). Linear terpenes are difficult to metabolize due to the presence of β -methyl groups that inhibit β -oxidation. The first steps of the catabolic pathway of citronellol and geraniol are the oxidation of the alcohols to the corresponding aldehydes and acids [citronellal, citronellate and geranial (citral), and geranylate] and subsequent activation to the corresponding CoA esters citronellyl-CoA and geranyl-CoA. Because of the structural similarity of citronellol and geraniol, it is assumed that oxidation of citronellol and geraniol is catalysed by the same enzymes (Fig. 1, Cantwell *et al.*, 1978). Citronellyl-CoA can be converted to geranyl-CoA by a dehydrogenase step, and all subsequent reactions are the same for citronellol and geraniol utilization. A key enzyme of the citronellol/geraniol degradation pathway is geranyl-CoA-carboxylase (Seubert *et al.*, 1963). Geranyl-CoA-carboxylase converts the branched-chain β -methyl group of geranyl-CoA to an acetate function. After hydratization of the carboxylated intermediate isohexenylglutaconyl-CoA by isohexenylglutaconyl-CoA hydratase the acetate side group is cleaved off

Abbreviation: Moco, molybdenum cofactor.

B. Höschle and D. Jendrossek

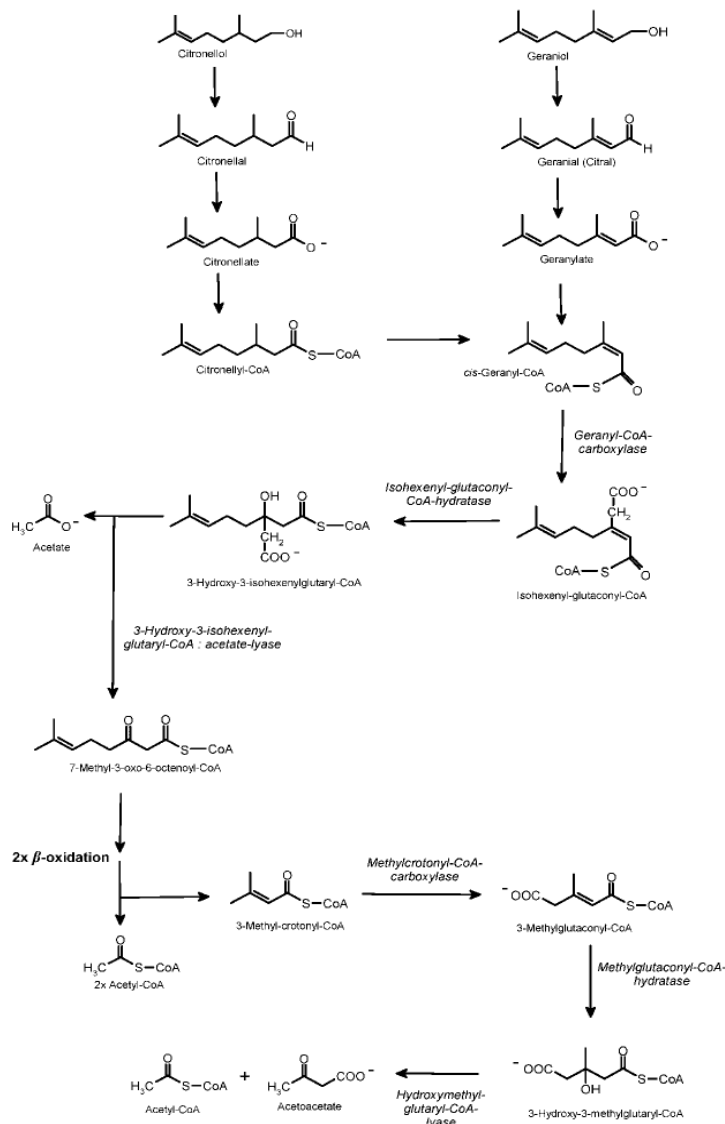


Fig. 1. Degradation pathway of citronellol and geraniol in *P. citronellolis* according to Seubert & Fass (1964b).

by 3-hydroxy-3-isohexenylglutaryl-CoA lyase (Seubert & Fass, 1964a). The major cleavage product of the lyase reaction (7-methyl-3-oxo-6-octenyl-CoA) can be degraded by two rounds of subsequent β -oxidation reactions without hindrance by β -methyl groups. The resulting metabolite (3-methylcrotonyl-CoA) is most probably degraded via the leucine degradation pathway, which involves another carboxylase that is unable to utilize geranyl-CoA as a substrate but that carboxylates methylcrotonyl-CoA (Seubert & Fass, 1964b; Hector & Fall, 1976). For an overview of the postulated citronellol/geraniol degradation pathway, see Fig. 1. The two branched-chain specific carboxylases of *P. citronellolis*, geranyl-CoA-carboxylase and methylcrotonyl-CoA

carboxylase, have been purified and biochemically characterized (Seubert *et al.*, 1963; Fall & Hector, 1977). *P. aeruginosa* and *Pseudomonas mendocina* are two additional bacteria with the capacity to utilize citronellol and other linear terpenes (Cantwell *et al.*, 1978). In this study, we initiated experiments to identify genes involved in the degradation pathway of geraniol in *P. aeruginosa*.

METHODS

Bacterial strains, plasmids and culture conditions. The bacterial strains and plasmids used in this study are shown in Table 1. Cultures of *P. aeruginosa* PAO1 were routinely grown in nutrient

Table 1. Bacterial strains and plasmids

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Reference or source
<i>Escherichia coli</i> JM109	Cloning strain	Yanisch-Perron <i>et al.</i> (1985)
<i>E. coli</i> S17-1	Mobilizing strain	Simon <i>et al.</i> (1983)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Wild-type	ATCC 15692
<i>P. aeruginosa</i> PAO1 Sm ^r	Spontaneous streptomycin-resistant mutant of PAO1 (≥ 500 µg ml ⁻¹), Sm ^r	This study
<i>P. aeruginosa</i> PAO1 Sm ^r #11-10-5	Transposon mutant of PAO1; Tc ^r	This study
<i>P. aeruginosa</i> PAO1 Sm ^r Δ3028	Knockout mutant in PA3028 with pKnockout-G::PA3028 in the genome; Sm ^r , Gm ^r	This study
<i>P. aeruginosa</i> PAO1 Sm ^r #11-10-5K	Transposon mutant #11-10-5 with pBBR1MCS-5:: <i>moeA2</i> ; Sm ^r , Tc ^r , Gm ^r	This study
pBluescript SK ⁺	Cloning vector	Stratagene
pBBR1MCS-5	Broad-host-range vector	Kovach <i>et al.</i> (1995)
pKnockout-G	Suicide vector for rapid gene inactivation in <i>P. aeruginosa</i>	Windgassen <i>et al.</i> (2000)
pUT miniTn5-Tc	Mutagenesis plasmid, Tc ^r	De Lorenzo <i>et al.</i> (1990)
pBluescript SK ⁺ ::11-10-5	Including the 2.8 kb <i>Pst</i> I-fragment with the mini-Tn5; Amp ^r , Tc ^r	This study
pKnockout-G::PA3028	Including a 3'- and 5'-truncated fragment of <i>moeA2</i> ; Amp ^r , Gm ^r	This study
pBBR1MCS-5:: <i>moeA2</i>	Including the gene PA3028; Gm ^r	This study

broth (NB) or in mineral salt medium (Schlegel *et al.*, 1961) containing different carbon sources [0.4% (w/v) sodium succinate, 0.1% (w/v) sodium citronellate, 0.1% (w/v) sodium geranylolate] at 30 °C. Water-insoluble carbon sources (citronellol, geraniol) were added in the space between the Petri dish and the agar (20 µl 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. Liquid cultures with citronellol or geraniol as carbon source additionally contained 4% (v/v) heptamethylnonane to reduce the toxic effect of the terpenes. Heptamethylnonane solubilizes citronellol and geraniol; it is water immiscible, non-toxic and not metabolized.

Growth experiments with tungstate and molybdate were done in Tris-buffered mineral salt medium (Mergeay *et al.*, 1985) with 10 mM sodium tungstate and 12 mM sodium molybdate. *Escherichia coli* strains were grown in Luria-Bertani (LB) media at 37 °C. Solid media additionally contained 1.5% (w/v) agar.

A mutant of *P. aeruginosa* PAO1 resistant to 500 µg streptomycin ml⁻¹ (*P. aeruginosa* PAO1 Sm^r) was isolated by two rounds of repeated transfer to NB media containing increasing amounts of streptomycin. For conjugation experiments, *P. aeruginosa* PAO1 Sm^r and *E. coli* S17-1 containing the respective plasmids were grown in NB medium and LB medium, respectively. Equal volumes of the donor and of the recipient culture were mixed and spotted onto a NB agar plate and incubated overnight at 30 °C. The cells were resuspended in 3 ml of 10 mM MgSO₄, plated on selection agar containing the appropriate amounts of antibiotics and incubated for 2 days at 30 °C. Selected transconjugants were screened for utilization of different carbon sources.

Identification and sequencing of transposon insertion fragments. *Pst*I- or *Xho*I-digested genomic DNA of selected transconjugants was analysed by Southern blot hybridization with a DIG-labelled PCR probe (forward primer, 5'-AATGCGCTCATCGTATCCTCGG-3'; backward primer, 5'-CGATCCTTGAAGCTGTCCCTGA-3') specific for the tetracycline resistance gene of the pUT mini-Tn5-Tc plasmid. Tn5-Tc-containing DNA fragments of the size of interest (2.5 ± 0.5 kb) were isolated from agarose gel, cloned in *Pst*I- or *Xho*I-digested pBluescriptSK⁺ and transformed

into *E. coli* JM109. Clones with plasmids harbouring the mini-Tn5-Tc fragment were selected on LB plates containing 12 µg tetracycline ml⁻¹.

Sequencing of the isolated recombinant plasmids containing the mini-Tn5-Tc fragment was done with synthetic oligonucleotides specific for the respective I- and O-ends (5'-AGTGAGGGT-TTGCAACTGC-3' and 5'-TTAAGCGTGCATAATAAGC-3'), and T3- and T7-primers specific for the multiple cloning site of the pBluescript SK⁺ vector. The mini-Tn5-Tc insertion site of the respective mutants was identified by comparison of the DNA sequences obtained with the updated database of the *Pseudomonas* Genome Project (www.pseudomonas.com).

Disruption of *moeA2*. Disruption of *moeA2* was carried out using pKnockout-G for rapid gene inactivation in *P. aeruginosa* (Windgassen *et al.*, 2000). A 3'- and 5'-truncated fragment of the *moeA2* gene was obtained by PCR-mediated amplification of the ORF PA3028 from *P. aeruginosa* genomic DNA using the synthetic oligonucleotides PA3028-fwd (5'-GGAATTCGCCGACAGCC-ATGGACGGCTAC-3') and PA3028-rev (5'-GGAATTCCTGCTCCAGGCGACCACGCAGGTACTC-3') as *moeA2*-specific primers. The *Eco*RI-digested purified 904 bp PCR fragment was cloned in the *Eco*RI site of pKnockout-G and transformed in *E. coli* S17-1. The plasmid pKnockout-G::PA3028 was transferred to *P. aeruginosa* PAO1 Sm^r via conjugation and selection on LB agar containing 500 µg streptomycin ml⁻¹ and 50 µg gentamicin ml⁻¹. The disruption of *moeA2* was verified by PCR using one *moeA2*-specific and one pKnockout-specific primer and by two Southern blot hybridization experiments of chromosomal mutant DNA with a DIG-labelled probe specific for the gentamicin resistance gene and a DIG-labelled probe specific for *moeA2*, respectively.

Genetic complementation. For genetic complementation of the *moeA2* mutant, *moeA2* was amplified from *P. aeruginosa* PAO1 genomic DNA with the synthetic oligonucleotides 3028-fwd (5'-CGGAATTCGGTTCATCGCCCGTGCAACTTCG-3') and 3028-rev (5'-CGGGATCCCGCCGGCGGCGCAATGAGAAC-3'). The purified *Bam*HI/*Eco*RI-digested 1332 bp fragment was cloned in the *Bam*HI/*Eco*RI opened vector pBBR1MCS-5 and transformed in *E. coli* S17-1. *E. coli* clones harbouring the recombinant plasmid were used for conjugative transfer of pBBR1MCS-5::*moeA2* to *P. aeruginosa*.

B. Höschle and D. Jendrossek

RESULTS

Isolation of mini-Tn5-Tc-induced mutants impaired in geraniol utilization

Mini-Tn5-Tc-induced mutants of *P. aeruginosa* PAO Sm^r were generated by conjugation with *E. coli* S17-1 (pUT mini-Tn5-Tc), as described in Methods, and selected on NB-Sm-Tc agar. About 8500 of the mutants obtained were tested for utilization of citronellol, citronellate, geraniol and geranylolate. In total, about 253 mutants showed significantly reduced growth on at least one of the four terpenes tested. Thirty-five additional mutants apparently represented auxotrophs, because they grew normally on complex media but showed no growth on mineral salt media independent of a carbon source. Auxotrophs were not further analysed. Thirty-nine of the 253 mutants (1.5%) specifically affected in the utilization of linear terpenes were strongly reduced in growth on geraniol but showed normal growth on the three other terpenes. Two hundred and fourteen mutants showed different combinations of more or less severe growth defects on one or more terpenes, including 129 mutants with partial growth reduction on geraniol. Only three mutants were unable to utilize any of the four tested terpenes. The high frequency of mutants that were defective in geraniol utilization but that showed normal growth on geranylolate, citronellol and citronellate was unexpected, because it was assumed that citronellol and geraniol were oxidized to the corresponding acids by the same enzymes (Seubert & Fass, 1964b; Cantwell *et al.*, 1978). Citronellol and geraniol differ only by the presence of one double bond (Fig. 1). Southern blot analysis of the mutants

specifically defective in growth on geraniol revealed that different gene loci were affected by mini-Tn5 insertion in many of the mutants, indicating that several genes are involved in the oxidation of geraniol and that oxidation of geraniol occurs independently from oxidation of citronellol (data not shown).

Identification of the mini-Tn5 insertion site in mutant #11-10-5

Mutant #11-10-5 (geraniol⁻, citronellol⁺, citronellate⁺, geranylolate⁺) was selected for further analysis. A 2.8 kbp *Pst*I fragment was identified as the site of mini-Tn5 insertion by Southern hybridization of chromosomal DNA of the mutants with a mini-Tn5-specific DNA probe (data not shown). The corresponding DNA fragment was cloned in *E. coli* by ligation of chromosomal *Pst*I fragments in pBluescriptSK⁺ and selection for Tc-resistant transformants. The site of mini-Tn5 insertion was identified by DNA sequencing of the respective recombinant plasmid and by comparing the obtained sequence information with the DNA sequences of mini-Tn5 and with the *P. aeruginosa* genome database (www.pseudomonas.com). It turned out that mini-Tn5 was inserted at position 3 392 394 within ORF PA3028 of the *P. aeruginosa* genome. PA3028 (*moeA2*) encodes a protein that is highly similar to molybdenum cofactor (Moco) biosynthesis proteins of *Pseudomonas syringae* (65% identity on amino acid level), *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens* (each 65%), *P. aeruginosa* (MoeA1, 51%), *E. coli* (41%) and to related proteins of many other bacteria.

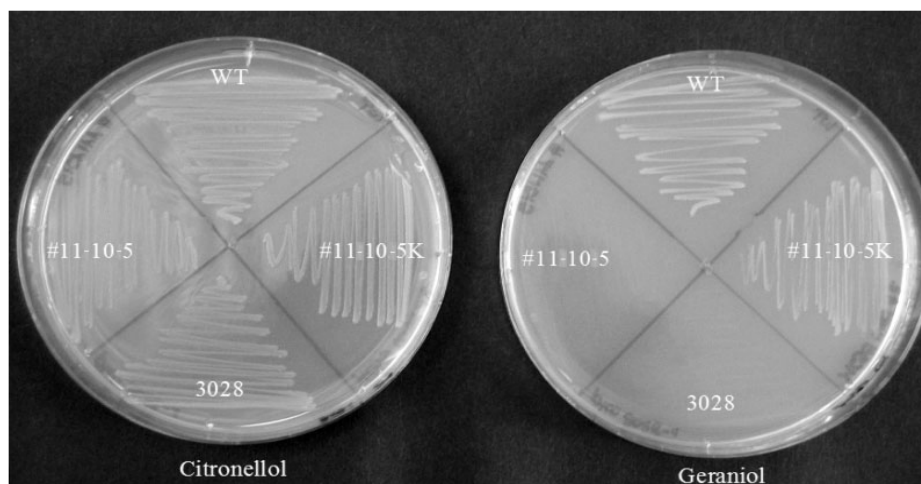


Fig. 2. Growth of the *P. aeruginosa* PAO1 wild-type (WT), the transposon mutant #11-10-5, the insertion mutant *P. aeruginosa* Sm^r-Δ3028 and the restored mutant *P. aeruginosa* #11-10-5K harbouring pBBR1MCS-5::*moeA2* on agar plates containing citronellol or geraniol as sole carbon source after 3 days of incubation at 30 °C.

Inactivation of *moeA2* in *P. aeruginosa* by insertion mutagenesis results in the geraniol-minus phenotype that can be restored by expression of an intact *moeA2* gene

To verify that the insertion of mini-Tn5 in mutant #11-10-5 was solely responsible for the observed geraniol-minus phenotype, chromosomal *moeA2* was inactivated using a truncated *moeA2* gene that had been PCR-amplified from chromosomal DNA and that had been cloned into pKnockout-G by conjugative insertion mutagenesis, as described in Methods. The success of chromosomal inactivation of *moeA2* was verified by Southern blot and PCR analysis (data not shown). When the resulting insertion mutant *P. aeruginosa* Sm^r-Δ3028 was tested for utilization of linear terpenes, the same phenotype (geraniol⁻, citronellol⁺, citronellate⁺, geranylate⁺) was obtained as for the mini-Tn5 mutant #11-10-5. The DNA sequence of PA3028 (*moeA2*) including 84 bp of the 5'-upstream region was PCR-amplified and cloned in pBBR1MCS-5 to yield pBBR1MCS-5::*moeA2*. When pBBR1MCS-5::*moeA2* was conjugatively transferred to *P. aeruginosa* #11-10-5, the ability to utilize geraniol as a sole source of carbon and energy was restored (Fig. 2).

Growth of *P. aeruginosa* on geraniol is dependent on molybdenum

The identification of *moeA2* as a target of mini-Tn5 insertion in mutant #11-10-5 suggests that growth of *P. aeruginosa* on geraniol might depend on molybdenum and might require intact Moco. Fig. 3(A) shows growth of *P. aeruginosa* PAO1 wild-type in liquid culture on succinate and on the four linear terpenes. The highest doubling time was obtained on succinate (t_d , 1.8 h), followed by citronellate (t_d , 2.3 h), citronellol (t_d , 2.9 h), geraniol (t_d , 9 h) and geranylate (t_d , 11 h). When the same growth experiment was repeated in the presence of 10 mM tungstate, a strong competitive inhibitor of molybdenum-dependent processes, almost identical doubling times were recorded for succinate, citronellol, citronellic acid and geranylate (Fig. 3B). However, growth on geraniol was very poor and stopped after one to two doublings in the presence of 10 mM tungstate. To investigate whether tungstate was a specific inhibitor of a molybdenum-dependent process or whether it was toxic for the cells during growth on geraniol, the experiment was repeated in the presence of 10 mM tungstate plus 12 mM molybdate (Fig. 3C). If tungstate acts as a general toxic compound, the addition of molybdate should not restore growth on geraniol. If, however, tungstate specifically inhibits molybdenum-dependent processes, the addition of high concentrations of molybdate should complement the inhibitory effect of tungstate. Exactly this was found, as shown in Fig. 3(C): growth of *P. aeruginosa* PAO1 in the presence of tungstate and molybdate could not be differentiated from growth in the absence of tungstate and molybdate. In conclusion, growth on geraniol is a molybdenum-requiring process in *P. aeruginosa*. The experiments were repeated on solid media

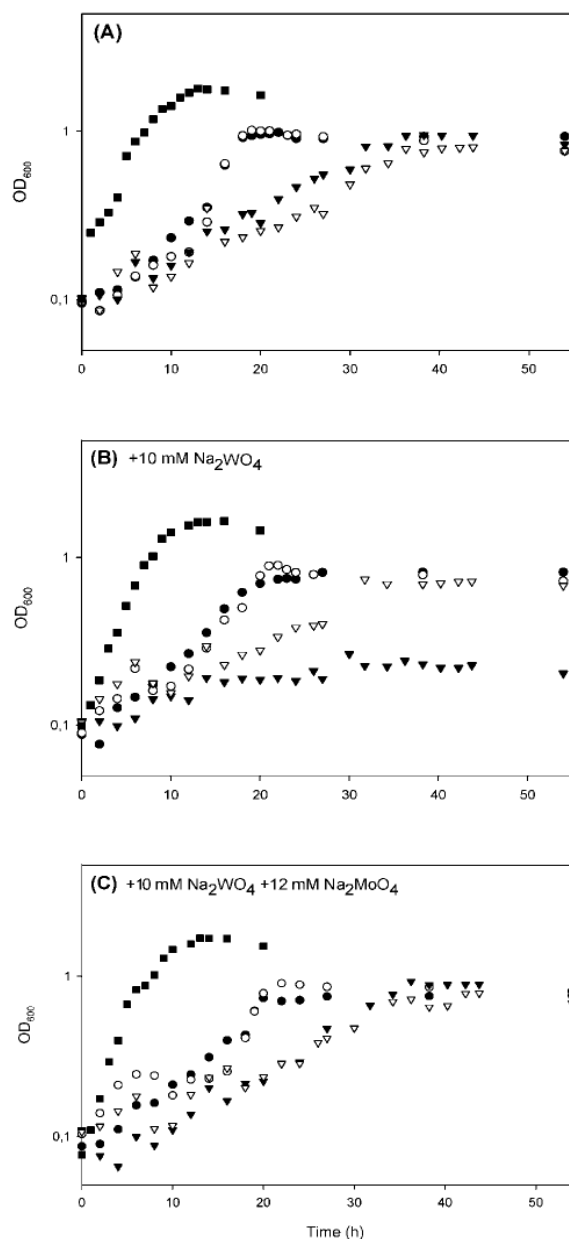


Fig. 3. Influence of tungstate on the growth of *P. aeruginosa* PAO1 wild-type in Tris-buffered medium with carbon sources as indicated. (A) no addition; (B) 10 mM sodium tungstate; (C) 10 mM sodium tungstate and 12 mM sodium molybdate. ●, Citronellol; ○, citronellic acid; ▼, geraniol; ▽, geranic acid; ■, succinate.

and the same principal results were obtained (data not shown). *P. aeruginosa* is also able to utilize geraniol as a carbon source. When growth of *P. aeruginosa* on geraniol

B. Höschle and D. Jendrossek

was tested, tungstate (10 mM) clearly inhibited the growth of the bacteria. Growth inhibition by tungstate was reversible by the addition of 12 mM molybdate. These results indicate that the oxidation of geraniol to geranic acid is a molybdenum-dependent step.

Utilization of geraniol in *P. citronellolis* and *P. mendocina* is not inhibited by tungstate

P. citronellolis and *P. mendocina* are close relatives of *P. aeruginosa* and are the only other validly described species capable of the utilization of linear terpenes such as citronellol and geraniol (Cantwell *et al.*, 1978). The biochemical pathway of linear terpene utilization in *P. citronellolis* and *P. mendocina* is assumed to be identical or very similar to that of *P. aeruginosa*. When the effect of tungstate (10 mM) on the growth of *P. citronellolis* and *P. mendocina* with citronellol, geraniol, citronellate or geranylate as carbon sources was analysed, no growth inhibition by tungstate on citronellol, geraniol and citronellate was found, and only slight growth inhibition on geraniol was observed. Apparently, the utilization of geraniol is different from that of *P. aeruginosa* in *P. citronellolis* and *P. mendocina*.

DISCUSSION

In this study, we investigated the catabolism of linear terpenes in *P. aeruginosa* by mini-Tn5 mutagenesis. To our surprise, a high frequency of mutants was obtained (39 mutants, 1.5%) that were specifically impaired in the utilization of geraniol but showed wild-type phenotypes with respect to the utilization of geranylate, citronellol and citronellate. The site of mini-Tn5 insertion in one of these mutants (#11-10-5) was within *moeA2*. *MoeA2* is a protein involved in the Moco biosynthesis of many bacteria. One other mutant with the same phenotype as #11-10-5 also harboured mini-Tn5 within *moeA2* (data not shown). In all other 37 mutants with growth reduction on geraniol, mini-Tn5 had integrated in different gene loci, as revealed by the different signal sizes in the Southern blots of chromosomal DNA of the mutants. In *E. coli* and in *Rhodobacter capsulatus*, *MoeA* is essential for the ligation of molybdate to molybdopterin (Leimkühler *et al.*, 1999; Nichols & Rajagopalan, 2005). The involvement of molybdenum in the oxidation of geraniol was confirmed by specific inhibition of the growth of *P. aeruginosa* on geraniol by tungstate and by the competitive reduction of growth inhibition by molybdate. Since growth on geraniol was also sensitive to tungstate, we assume that the oxidation of geraniol to geranylate by a geraniol dehydrogenase is the molybdenum-dependent step. However, our experiments do not exclude the possibility that the oxidation of geraniol to geranic acid is also molybdenum dependent. The sensitivity of geraniol utilization to tungstate was restricted to *P. aeruginosa* and was only partially observed in *P. citronellolis* or *P. mendocina*. These results indicate that the oxidation of geraniol to geranylate is a molybdenum-dependent step, and that the respective oxidation reactions could be catalysed

by different enzymes in *P. aeruginosa* on the one hand and in *P. citronellolis* and *P. mendocina* on the other, or can be partially replaced by molybdenum-independent isoenzymes in the latter two species. The involvement of molybdenum-dependent steps is supported by the high frequency of the geraniol-minus phenotype in *P. aeruginosa* mini-Tn5 mutants: synthesis of active Moco requires several enzymic steps and the combined action of many gene products (Nichols & Rajagopalan, 2002; Wuebbens & Rajagopalan, 2003). Mutation in only one of these steps prevents the synthesis of active Moco, thus leading to a geraniol-minus phenotype. We assume that at least some of the other geraniol-minus mutants have defects in other genes of Moco synthesis. Since utilization of citronellol was neither reduced in nor sensitive to the presence of tungstate in both *moeA2* mutants (mini-Tn5 mutant #11-10-5 and the *moeA2* insertion mutant), we conclude that oxidation of citronellol is not molybdenum dependent in *P. aeruginosa* and therefore is apparently catalysed by different enzymes compared to oxidation of geraniol, and also that these different sets of enzymes cannot substitute for each other in *P. aeruginosa*. Other well-studied examples of molybdenum-dependent oxidation reactions are molybdenum hydroxylases (e.g. xanthin dehydrogenase), eukaryotic oxotransferases (e.g. sulfite oxidase, nitrate reductase) and bacterial oxotransferases (e.g. formate dehydrogenase, DMSO reductase) (Hille, 1999; Moura *et al.*, 2004 and references cited therein).

Recently, a gene cluster comprising two putative operons (PA2011 to PA2014 and PA2015 to PA2016) has been identified to be involved in the degradation of linear terpenes in *P. aeruginosa* (Diaz-Perez *et al.*, 2004). Insertion mutagenesis in five of the six genes resulted in the inability of the respective mutants to utilize citronellol, geraniol and related linear terpenes. The cluster contains putative genes for carboxylase subunits and other genes apparently involved in the degradation of acyclic terpenes, but it contains no genes with apparent function in Moco synthesis. Conjugative transfer of the cluster to *P. fluorescens* did not result in the ability of the transconjugants to utilize linear terpenes. The results of Diaz-Perez *et al.* (2004) and our studies indicate that the ability to utilize linear terpenes is complex, depends on more genes than have yet been identified and may be partially different in *P. aeruginosa* and *P. citronellolis*.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank R. Schäfer for assistance in mutant isolation and K. E. Jaeger for providing pKnockout.

REFERENCES

- 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.

- de Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U. & 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.
- 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**, 5102–5110.
- Fall, R. R. & Hector, M. L. (1977). Acyl-coenzyme A carboxylases. Homologous 3-methylcrotonyl-CoA and geranyl-CoA carboxylases from *Pseudomonas citronellolis*. *Biochemistry* **16**, 4000–4005.
- Hector, M. L. & Fall, R. R. (1976). Multiple acyl-coenzyme A carboxylases in *Pseudomonas citronellolis*. *Biochemistry* **15**, 3465–3472.
- Hille, R. (1999). Molybdenum enzymes. *Essays Biochem* **34**, 125–137.
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M. & Peterson, K. M. (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**, 175–176.
- Leimkühler, S., Angermüller, S., Schwarz, G., Mendel, R. R. & Klipp, W. (1999). Activity of the molybdopterin-containing xanthin dehydrogenase of *Rhodobacter capsulatus* can be restored by high molybdenum concentrations in a *moeA* mutant defective in molybdenum cofactor biosynthesis. *J Bacteriol* **181**, 5930–5939.
- Mergeay, M., Nies, D., Schlegel, H. G., Gerits, J., Charles, P. & Van Gijsegem, F. (1985). *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *J Bacteriol* **162**, 328–334.
- Moura, J. J., Brondino, C. D., Trincao, J. & Romao, M. J. (2004). Mo and W bis-MGD enzymes: nitrate reductases and formate dehydrogenases. *J Biol Inorg Chem* **9**, 791–799.
- Nichols, J. & Rajagopalan, K. V. (2002). *Escherichia coli* MoeA and MogA. Function in metal incorporation step of molybdenum cofactor biosynthesis. *J Biol Chem* **277**, 24995–25000.
- Nichols, J. D. & Rajagopalan, K. V. (2005). In vitro molybdenum ligation to molybdopterin using purified components. *J Biol Chem* **280**, 7817–7822.
- 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 citronellolis* n.sp. *J Bacteriol* **79**, 426–434.
- 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. *Biochem Z* **341**, 23–34.
- Seubert, W. & Fass, E. (1964b). Untersuchungen über den bakteriellen Abbau von Isoprenoiden: V. Der Mechanismus des Isoprenoidabbaues. *Biochem Z* **341**, 35–44.
- Seubert, W., Fass, E. & Remberger, U. (1963). Untersuchungen über den bakteriellen Abbau von Isoprenoiden: III. Reinigung und Eigenschaften der Geranylcarboxylase. *Biochem Z* **338**, 265–275.
- Simon, R., Priefer, U. & Pühler, A. (1983). A broad host-range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Biotechnology* **1**, 784–791.
- Windgassen, M., Urban, A. & Jaeger, K. E. (2000). Rapid gene inactivation in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* **193**, 201–205.
- Wuebbens, M. M. & Rajagopalan, K. V. (2003). Mechanistic and mutational studies of *Escherichia coli* molybdopterin synthase clarify the final step of molybdopterin biosynthesis. *J Biol Chem* **278**, 14523–14532.
- 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.

Appendix 2

Microbiology (2005), 151, 3649–3656

DOI 10.1099/mic.0.28260-0

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*

Birgit Höschle,¹ Volker Gnau² and Dieter Jendrossek¹

¹Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart, Allmandring 31, 70550 Stuttgart, Germany

²Universität Tübingen, Tübingen, Germany

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

Received 10 June 2005
Revised 29 July 2005
Accepted 5 August 2005

Pseudomonas aeruginosa is able to grow on acyclic monoterpenes (citronellol, citronellate, geraniol and geranylate), and on other methyl-branched compounds such as leucine or isovalerate. The catabolic pathway of citronellol (Atu, acyclic terpene utilization) enters that of leucine/isovalerate (Liu, leucine and isovalerate utilization) at the level of methylcrotonyl-CoA. Key enzymes of the combined pathways are geranyl-CoA carboxylase (GCCase) and methylcrotonyl-CoA carboxylase (MCCase). In this study, isovalerate-grown cells specifically expressed MCCase (apparent molecular mass of the biotin-containing subunit, 74 kDa) only, and the GCCase biotin-containing subunit (71 kDa) was not detected. Citronellol- or citronellate-grown cells produced both carboxylases. Biotin-dependent proteins were purified from crude extracts by avidin-affinity chromatography, and assigned to the corresponding coding genes by trypsin fingerprint analysis. The two subunits of MCCase corresponded to *liuB/liuD* (PA2014/PA2012) of the *P. aeruginosa* genome database, and *atuC/atuF* (PA2888/PA2891) encoded GCCase subunits. This finding is contrary to that reported by others. The identified genes are part of two separate gene clusters [*liuRABCDE* (PA2011–PA2016) and *atuABCDEFGH* (PA2886–PA2893)] that are thought to encode most of the genes of the Atu and Liu pathways.

INTRODUCTION

Citronellol (3,7-dimethyloct-6-en-1-ol) and geraniol (3,7-dimethylocta-2,6-dien-1-ol) are model compounds of acyclic monoterpenes, which occur naturally in plants. Citronellol and geraniol are of industrial interest due to their commercial use in the food (flavour) and perfume (odour) industries. Moreover, citronellol is one of very few naturally occurring repellents of insects (mosquitoes) (Hierro *et al.*, 2004; Pawar *et al.*, 1991; Rice & Coats, 1994). Geraniol is structurally related to citronellol, and differs only by the presence of an additional double bond. Recently, it was found that geraniol and related compounds have significant effects on eukaryotic and human cells, and are able to induce apoptosis *in vitro* in pancreatic cancer cells (Burke *et al.*, 1997, 2002; Carnesecchi *et al.*, 2002a, b, 2004; Duncan *et al.*, 2004; Izumi *et al.*, 1999). The intensity and variety of biological activities of monoterpenes and related compounds have not been fully investigated. A lack of information on

the biochemical routes of monoterpenes in organisms might be one reason for the shortage of knowledge. Citronellol is the only acyclic monoterpene for which some information exists on its biochemistry in micro-organisms. This knowledge is based mainly on investigations performed by Seubert and coworkers with *Pseudomonas citronellolis* more than 40 years ago (Seubert, 1960; Seubert *et al.*, 1963; Seubert & Remberger, 1963; Seubert & Fass, 1964a, b), and these were continued by Fall and coworkers in the late 1970s (Cantwell *et al.*, 1978; Fall & Hector, 1977; Fall *et al.*, 1979; Hector & Fall, 1976a, b). The first steps of the catabolic pathway of citronellol and geraniol are the oxidation of the alcohols to citronellate or geranylate, and subsequent activation to the corresponding CoA esters citronellyl-CoA and geranyl-CoA. Due to the structural similarity of citronellol and geraniol, it is assumed that oxidation of citronellol and geraniol is catalysed by the same enzymes (Fig. 1). However, recent data suggest that oxidation of geraniol and/or geraniol is dependent on molybdenum, and that the reaction is different from molybdenum-independent oxidation of citronellol (Höschle & Jendrossek, 2005). Citronellyl-CoA can be converted to geranyl-CoA by a dehydrogenase step, and all

Abbreviations: Atu, acyclic terpene utilization; GCCase, geranyl-CoA carboxylase; Liu, leucine and isovalerate utilization; MCCase, methylcrotonyl-CoA carboxylase.

B. Höschle, V. Gnu and D. Jendrossek

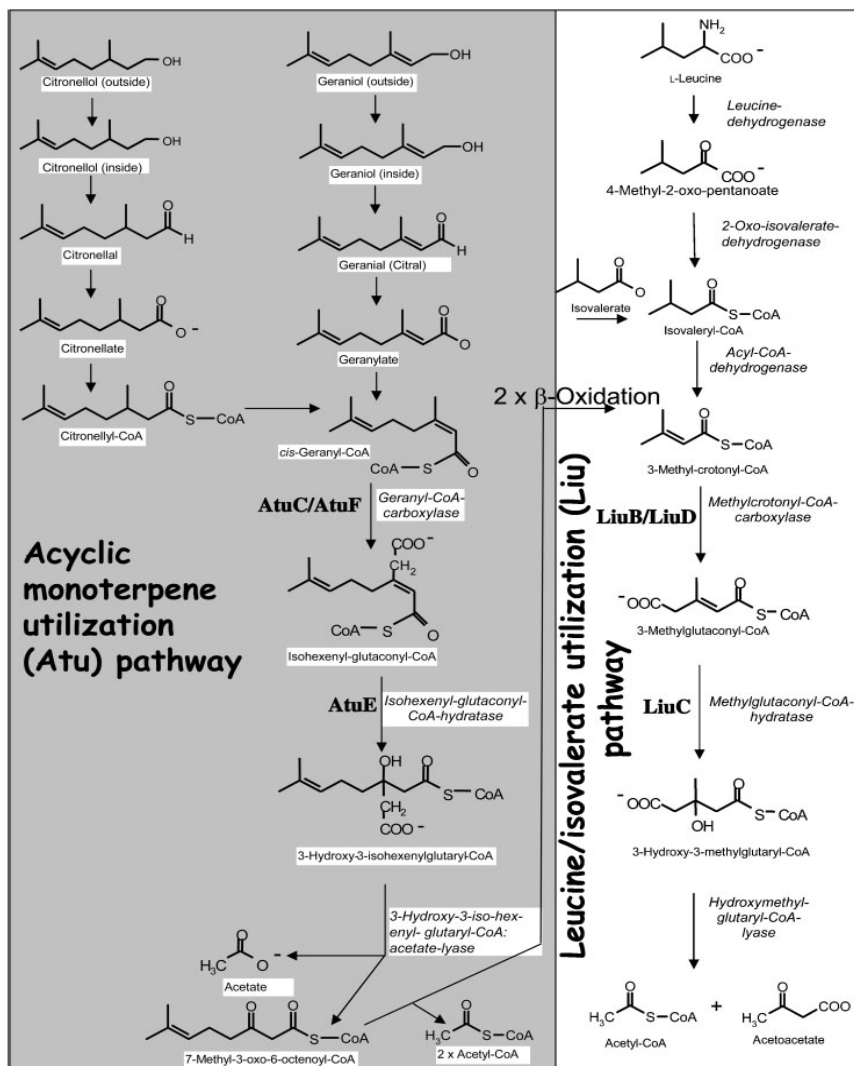


Fig. 1. Putative Atu and Liu pathways in *P. citronellolis*, according to Seubert & Fass (1964a). Genes of *P. aeruginosa* PAO1 identified in this study (*atuC/atuF* and *liuB/liuD*), and putative isohexenyl-glutaconyl-CoA hydratase (*atuE*) and methylglutaconyl-CoA hydratase (*liuC*) genes, are indicated.

subsequent reactions are the same for citronellol and geraniol utilization. Geranyl-CoA is difficult to metabolize because of the presence of β -methyl groups that inhibit β 3-oxidation. The key enzyme of the citronellol/geraniol degradation pathway is geranyl-CoA carboxylase (GCCase) (Seubert *et al.*, 1963). GCCase converts the branched-chain β -methyl group of geranyl-CoA to an acetate group that can be cleaved off more easily than a methyl group. For details of the catabolic pathway of citronellol/geraniol see Fig. 1.

The metabolite 7-methyl-3-oxo-6-octenoyl-CoA can be degraded by two rounds of subsequent β -oxidation reactions, without hindrance by β -methyl groups. The resulting metabolite (3-methylcrotonyl-CoA) is degraded via the leucine/isovalerate utilization (Liu) pathway (Fig. 1), which involves another carboxylase (methylcrotonyl-CoA carboxylase, MCCase) that is unable to utilize geranyl-CoA as a substrate, but is able to utilize carboxylate methylcrotonyl-CoA (Fall & Hector, 1977; Fall, 1981; Hector & Fall, 1976a,

b). The two branched-chain-specific carboxylases GCase and MCase have been purified and partially characterized in *P. citronellolis* (Fall & Hector, 1977).

Pseudomonas aeruginosa and *Pseudomonas mendocina* are two additional bacteria with the capacity to utilize citronellol and other linear terpenes (Cantwell *et al.*, 1978). Recently, utilization of citronellol by *P. aeruginosa* was investigated by Diaz-Perez and coworkers (Diaz-Perez *et al.*, 2004). Those authors cloned a gene cluster consisting of six genes (PA2011–PA2016) that are necessary for growth on linear terpenes in *P. aeruginosa*. The cluster contained two genes (*gnyA/gnyB*, PA2012/PA2014) for putative carboxylase subunits, and other genes that possibly encode proteins of the acyclic (mono-) terpene utilization (Atu) pathway. In our present study, we initiated investigation of the Atu pathway by a biochemical approach, and we came to different conclusions than those of Diaz-Perez and coworkers.

METHODS

Bacterial strains, plasmids and culture conditions. The bacterial strains and plasmids used in this study are shown in Table 1. Cultures of *P. aeruginosa* PAO1 were routinely grown in Luria-Bertani (LB) medium, or in mineral salt medium (Schlegel *et al.*, 1961) containing different carbon sources [0.1% (v/v) sodium citronellate, 0.1% (v/v) sodium geranylacetate or 0.1% (v/v) isovaleric acid], at 30 °C. Water-insoluble carbon sources (citronellol and geraniol) were added in the space between the Petri dish and the agar (20 µl 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. Liquid cultures contained 0.5% glucose or 0.1% glucose, and either 0.2% sodium citronellate or 0.2% isovalerate. The *Escherichia coli* strain was grown in LB medium at 37 °C. Solid media contained 1.5% (w/v) agar.

For conjugation experiments, *P. aeruginosa* PAO1 Sm^r and *E. coli* S17-1, containing the respective plasmids, were grown in LB medium. Equal volumes of the donor and the recipient cultures were mixed, spotted onto an LB agar plate, and incubated for 6 h at 37 °C. The cells were resuspended in 0.5 ml saline, plated on selective agar containing 500 µg streptomycin ml⁻¹ and 50 µg gentamicin ml⁻¹, and incubated overnight at 37 °C.

Insertion mutagenesis. Disruption of *atuF* (PA2891) in *P. aeruginosa* was carried out using pKnockout-G for rapid gene inactivation (Windgassen *et al.*, 2000). A 3'- and 5'-truncated fragment of *atuF* was

obtained by PCR-mediated amplification of *atuF* from *P. aeruginosa* genomic DNA using the synthetic oligonucleotides PA2891-*EcoRI*-Fwd (5'-GGAATTCGCGCCGAGCTGATCCTGGAGAGG-3') and PA2891-*EcoRI*-Rev (5'-GGAATTCCTGGGGTCTTCGGCGAAGCG-TTC-3') as primers. The *EcoRI*-digested purified 778 bp PCR fragment of *atuF* was cloned in the *EcoRI* site of pKnockout-G, and transformed in *E. coli* S17-1. The plasmid pKnockout-G::*atuF* was transferred to *P. aeruginosa* PAO1 Sm^r via conjugation, and transconjugants were selected on LB agar containing 500 µg streptomycin ml⁻¹ and 50 µg gentamicin ml⁻¹. The disruption of *atuF* was verified by (i) PCR using one *atuF*-specific primer and one pKnockout-specific primer, and (ii) two Southern blot hybridization experiments of chromosomal mutant DNA with a DIG-labelled probe specific for the gentamicin-resistance gene, and a DIG-labelled probe specific for *atuF*.

Isolation of biotin-containing proteins, Western blot analysis and trypsin fingerprint analysis. Late-exponential cells were collected by centrifugation at 4 °C, and washed with mineral salt medium that did not contain a carbon source. The pellet was resuspended in 25 mM Tris/HCl buffer, pH 7.5, at 1 ml (g cells)⁻¹. The suspension was passed two times through a French press cell at 800 p.s.i. (5.5 MPa). Cell debris and membrane fragments were removed by centrifugation at 80 000 g in a Beckman rotor Ti50 for 1 h at 4 °C. The supernatant was used for further analysis. The isolation of biotin-containing proteins was done with immobilized monomeric avidin. A small column was packed with 250 µl immobilized monomeric avidin, and equilibrated with PBS containing 0.1 M phosphate buffer, 0.15 M NaCl, pH 7.0. A 250 µl volume of the crude extract was applied to the column, which was then washed six times with 1 vol. PBS. Biotin-containing proteins were eluted from the column with elution buffer (2 mM D-biotin in PBS). The column was regenerated by washing two times with 0.1 M glycine HCl, pH 2.8.

Samples were separated by 10% SDS-PAGE, and either stained with Coomassie blue, or transferred to PVDF membranes for Western blot analysis. Protein bands of interest were cut out, and subjected to trypsin digestion and subsequent LC-MS/MS analysis. Western blotting was done by standard procedures. The blotted biotin-containing proteins were tagged with Streptavidin-AP conjugate (Roche), and the colour development was done with nitroblue tetrazolium chloride (NBT) and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate *p*-toluidine salt (BCIP). Prestained dual-colour SDS-PAGE standard proteins (Bio-Rad) were used as marker proteins.

Nanoflow liquid chromatography tandem MS (nano-LC-MS/MS). Reverse-phase nano-LC-MS/MS was performed using an Ultimate nanoflow LC system (LC Packings). The LC system was coupled to a QSTAR Pulsar hybrid qTOF mass spectrometer (AB-MDS Sciex), which used a modified nano-electrospray ion source (Proxeon Biosystems) interface. Briefly, the tryptic peptide mixtures

Table 1. Bacterial strains and plasmids

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Reference or source
<i>E. coli</i> S17-1	Mobilizing strain	Simon <i>et al.</i> (1983)
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Wild-type	ATCC 15692
<i>P. aeruginosa</i> PAO1 Sm ^r	Spontaneous streptomycin-resistant mutant of PAO1; Sm ^r (≥ 500 µg ml ⁻¹)	Höschle & Jendrossek (2005)
<i>P. aeruginosa</i> PAO1 Sm ^r ins- <i>atuF</i>	Knockout mutant in <i>atuF</i> with pKnockout-G:: <i>atuF</i> in the genome; 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:: <i>atuF</i>	Including a 3'- and 5'-truncated fragment of <i>atuF</i> ; Ap ^r , Gm ^r	This study

B. Höschle, V. Gnu and D. Jendrossek

were autosampled at a flow rate of $50 \mu\text{l min}^{-1}$ in 0.1% aqueous trifluoroacetic acid, and desalted on a PepMap C18 trapping cartridge (LC Packings). The trapped peptides were eluted and separated on the analytical column (PepMap C18, $75 \mu\text{m i.d.} \times 15 \text{cm}$; LC Packings) using a linear gradient of 7–50% acetonitrile in 0.5% formic acid for 30 min at a flow rate of 200nl min^{-1} , and ionized by an applied voltage of 2.2 kV to the emitter.

The mass spectrometer was operated in data-dependent acquisition mode to automatically switch between MS and MS/MS. Survey MS spectra were acquired for 1 s, and the three most intense ions (doubly, triply or quadruply charged) were isolated, and sequentially fragmented for 1.5 s by low-energy collision-induced dissociation. All MS and MS/MS spectra were acquired with the Q2-pulsing function switched on, and optimized for enhanced transmission of ions in the MS (m/z 400–1000) and MS/MS (m/z 75–1300) mass ranges.

RESULTS

Biotin-containing proteins of *P. aeruginosa* PAO1 were purified from (i) glucose-, (ii) citronellate- and (iii) isovalerate-grown cells, separated by reducing SDS-PAGE (Fig. 2A), and screened for biotin by Western blot analysis (Fig. 2B), as described in Methods. Only one biotin-containing polypeptide (apparent molecular mass 63 kDa) was found in glucose-grown cells. This protein was constitutively expressed, and apparently is not involved in carboxylation of methyl-branched compounds (see below). One additional biotin-containing polypeptide appeared at about 74 kDa in isovalerate-grown cells. This protein

presumably corresponds to the biotin-containing subunit of MCCase, because the catabolic pathway of leucine/isovalerate involves only one carboxylase step (MCCase). Specific induction of MCCase by leucine and isovalerate has been shown for *P. citronellolis* (Fall & Hector, 1977; Hector & Fall, 1976a, b). In citronellate-grown cells of *P. aeruginosa*, a third biotin-dependent protein at about 71 kDa appeared in addition to the 63 and 74 kDa proteins (Fig. 2B). Since GCCase is necessary only in citronellol/citronellate-grown cells, but not in isovalerate-grown cells, the 71 kDa protein is thought to correspond to GCCase.

The purified biotin-containing proteins of citronellate-grown cells (Fig. 2A) were cut out from the Coomassie-stained SDS-polyacrylamide gel, and subjected to trypsin fingerprint analysis and ESI-MS-MS (double or multiple mass spectra)-based amino acid sequencing. At least 13 peptides of each isolated biotin-containing protein were analysed, and compared with the *P. aeruginosa* database. The 63 kDa biotin band (band no. 3, Fig. 2A) perfectly matched to the putative product of ORF PA5435 (putative acetyl-CoA carboxylase/transcarboxylase subunit), and the 74 kDa (no. 1) and 71 kDa (no. 2) biotin-containing proteins were unequivocally identified as the gene products of *liuD* (PA2012; 74 kDa) and *atuF* (PA2891; 71 kDa), respectively (Figs 2 and 3). The three non-biotin-containing polypeptides (band nos 4/5 and 6, Fig. 2A) corresponded to *liuB* (PA2014), *atuC* (PA2888) and the product of PA5436, respectively.

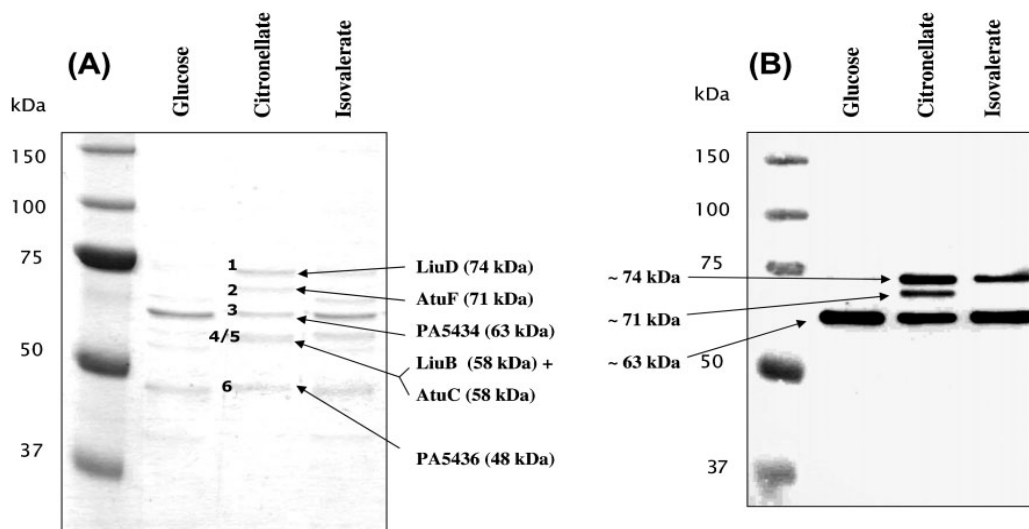


Fig. 2. SDS-PAGE and Western blot analysis of *P. aeruginosa* PAO1 for biotin-containing proteins. After avidin purification, soluble cell extracts were separated on 10% SDS-polyacrylamide gels and stained with Coomassie blue (A), or transferred to PVDF membranes and screened for biotin-containing proteins (B), as described in Methods. To obtain sufficient resolution in the range above 50 kDa, electrophoresis was carried out for about 90 min (20–25 mA) so that proteins of less than ~25 kDa had run out of the gel. Gene products identified by trypsin fingerprint LC-MS analysis of isolated protein bands are indicated. The numbering of the protein bands in (A) is described in the text.

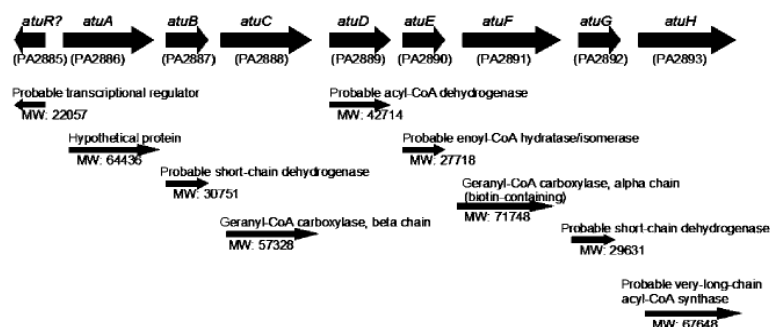
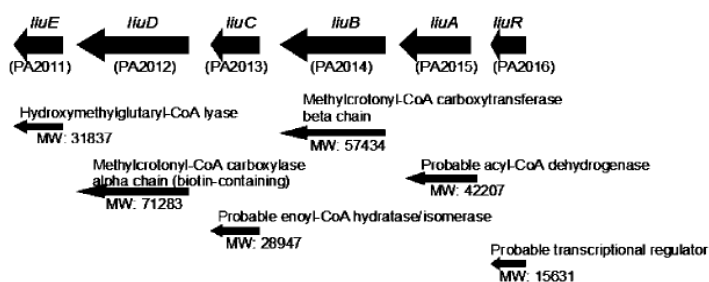
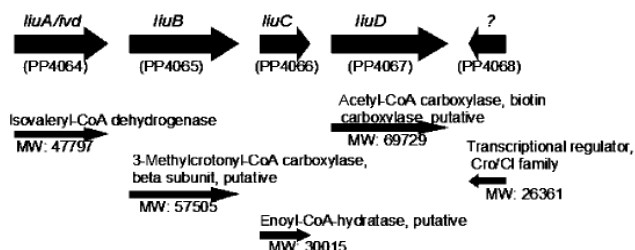
(A) *P. aeruginosa* *atu* cluster(B) *P. aeruginosa* *liu* cluster(C) *P. putida*, putative *liu* cluster

Fig. 3. Gene clusters of *P. aeruginosa* PAO1 (A, B) (*atu* and *liu*, respectively), and putative *liu* cluster of *P. putida* (C) (data and annotations are from <http://www.pseudomonas.com> and <http://www.tigr.org>). Note that the involvement of PA2885 (*atuR?*) in *Atu* is hypothetical, and is not supported by experimental data. The deduced molecular weight (MW) of each gene product in Da is shown.

respectively, and represent the non-biotin-containing carboxylase subunits (LiuB and *Atu*C were not separated in the double band no. 4/5). The genes *liuA* and *atuF* have been annotated as biotin-containing subunits of carboxylases in the *P. aeruginosa* database (Fig. 3). *LiuB* and *liuD* have been proposed to encode GCCase (corresponding to *gnyA* and *gnyB*; Diaz-Perez *et al.*, 2004), and PA2888 and PA2891 (*atuC* and *atuF*) have been suggested to encode MCCase; this is contrary to our findings. Our Western blot results shown in Fig. 2, i.e. the findings that the 71 kDa band

was expressed only in citronellate-grown cells, and that the 74 kDa band was expressed in both citronellate- and isovalerate-grown cells, suggest that *liuB* and *liuD* encode MCCase (74 kDa), and that *atuC* and *atuF* encode GCCase (71 kDa). The DNA-deduced molecular masses of *LiuD* and *AtuF* are 71 283 and 71 748 Da, respectively. The reason for the discrepancy in the theoretical values compared with the observed apparent molecular masses is unknown, but it is often observed in SDS-PAGE, and may depend on the individual amino acid sequence/composition.

B. Höschle, V. Gnu and D. Jendrossek

What could be the reason for the contrary conclusions concerning the assignment of LiuB/LiuD and AtuC/AtuF to MCase and GCCase subunits? Diaz-Perez *et al.* (2004) also noticed the relatedness of LiuB/LiuD and AtuC/AtuF; they assumed that the compound 6-methyl-5-hepten-2-one would enter the combined citronellol/leucine degrading pathway at the level of methylcrotonyl-CoA, and considered growth of insertion mutants in the *liu* gene cluster on 6-methyl-5-hepten-2-one as evidence for the functionality of the leucine utilization pathway. However, it is unclear how catabolism of the eight-carbon-atom-containing compound 6-methyl-5-hepten-2-one concurs with the five-carbon-atom compound methylcrotonylate (CoA-derivative). Nevertheless, we tested growth of *P. aeruginosa* PAO1 on 6-methyl-5-hepten-2-one, and, surprisingly, we did not observe significant growth on this compound. We tested six other strains of *P. aeruginosa* (HABS1, CF-3MR, PAC1, B104, PA81 and HAB911), and we used different concentrations and different methods of carbon source application (filter paper soaked in 6-methyl-5-hepten-2-one, and inserted into the lid of the Petri dish; 20 µl 6-methyl-5-hepten-2-one spotted into the space between the bottom of the Petri dish and the agar; and 6-methyl-5-hepten-2-one applied by saturated atmosphere in a sealed container). We did not find growth for any of the seven strains that was stronger than that of controls without the carbon source (30 and 37 °C, and periods of up to 1 week, were tested). We concluded that *P. aeruginosa* is unable to use 6-methyl-5-hepten-2-one as a sole source of carbon and energy, and that growth on 6-methyl-5-hepten-2-one is not a suitable tool to test the functionality of the Liu pathway in *P. aeruginosa*. The assay for growth on isovalerate and/or leucine appears to be a more reliable tool for this purpose, since leucine and isovalerate are precursors of methylcrotonyl-CoA in catabolic pathways of many organisms (Fig. 1). Inspection of the genome of another related species, *Pseudomonas putida*, a bacterium that is able to grow on isovalerate, but unable to utilize citronellol or citronellate, and therefore is unlikely to have the genes for the Atu pathway, revealed the presence of a cluster containing four genes (PP4064–PP4067, Fig. 3). The deduced amino acid sequences of ORFs PP4064–PP4067 showed a much higher degree of similarity (67–87% amino acid identity) to LiuA–LiuE of *P. aeruginosa*, but only a medium level of similarity to AtuA–AtuH (35–51% identity). We assume that ORFs PP4064–PP4067 code for several genes of the leucine/isovalerate-degrading pathway in *P. putida*, and we suggest naming them *liu* genes (Fig. 3).

To find further experimental evidence for our interpretation, insertion mutagenesis of *atuF* (putative GCCase biotin subunit, 71 kDa) was performed as described in Methods. The success of insertion mutagenesis was confirmed by PCR and Southern blot analysis of genomic DNA isolated from the respective mutants (data not shown). When the *P. aeruginosa* mutant with an insertion in *atuF* was tested for utilization of methyl-branched compounds, no growth was found on aliphatic monoterpenes such as citronellol, citronellate, geraniol and geranylolate, confirming

the involvement of *atuF* in utilization of citronellol and related monoterpenes. However, utilization of isovalerate and leucine was the same in the *atuF* mutant as in the wild-type. Growth on substrates unrelated to methyl-branched compounds (e.g. glucose, succinate or acetate) was also not affected. This result clearly shows that MCase and a functional Liu pathway are present in the *atuF* insertion mutant (Fig. 1). Accordingly, Western blot analysis of isovalerate-grown mutant cells for the presence of biotin-containing proteins showed the expected 74 kDa band, and confirmed that MCase was expressed (Fig. 4). After growth on isovalerate, the biotin-containing proteins of the *atuF* mutant were purified by avidin-affinity chromatography. The identity of the isolated 74 kDa band with the *liuA* gene product, and with the 74 kDa protein of the wild-type, was confirmed by trypsin fingerprint analysis of the avidin-isolated protein. The 63 kDa protein was again identified as PA5435 product (putative acetyl-CoA carboxylase/transcarboxylase subunit). The 71 kDa biotin protein was not found in mutant cells that had been incubated in the presence of citronellate for different time periods (Fig. 4), and this confirmed the absence of GCCase in the *atuF* insertion mutant. The non-biotin-containing subunits of the purified proteins (58 and 48 kDa) were identified to correspond to LiuB and PA5436 product by trypsin fingerprint analysis MS (data not shown).

DISCUSSION

In this study, we continued our investigation of the catabolism of acyclic (mono-) terpenes in *P. aeruginosa*. A

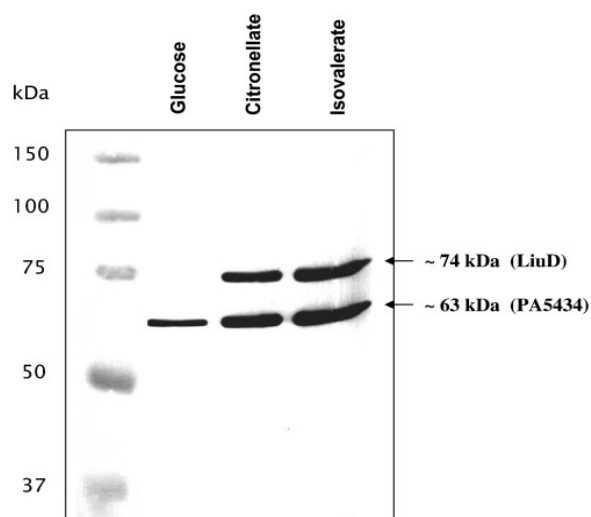


Fig. 4. Western blot analysis of biotin-containing proteins in avidin-purified crude extracts of *P. aeruginosa* (*atuF*-insertion mutant) grown on glucose (0.5%), glucose (0.1%) plus citronellate (0.2%), and glucose (0.1%) plus isovalerate (0.2%).

putative pathway leading from citronellol to acetate, acetyl-CoA and acetoacetate as end products, based on biochemical investigations in *P. citronellolis* by Seubert and coworkers more than 40 years ago (Seubert, 1960; Seubert *et al.*, 1963; Seubert & Remberger, 1963; Seubert & Fass, 1964a, b), is shown in Fig. 1. The pathway includes three phases. (i) Citronellol is first oxidized and activated to geranyl-CoA. Geranyl-CoA is subsequently carboxylated by GCCase, hydrated, and the resulting product is cleaved into acetate and 7-methyl-3-oxo-6-octenoyl-CoA (Atu pathway). (ii) 7-Methyl-3-oxo-6-octenoyl-CoA can be degraded by two rounds of subsequent β -oxidation reactions without hindrance by β -methyl groups. (iii) The product 3-methylcrotonyl-CoA concurs with the Liu pathway, which includes a second carboxylation step by MCCase. The latter carboxylase is specific for 3-methylcrotonyl-CoA, and is unable to utilize geranyl-CoA as a substrate (Fall & Hector, 1977). Acetate, acetyl-CoA and acetoacetate are the end products of the combined pathways. While the Atu pathway is present presumably in citronellol-degrading bacteria only (*P. citronellolis*, *P. aeruginosa* and *P. mendocina*), the Liu pathway probably is present in many organisms, at least in isovalerate- and leucine-utilizing bacteria. The finding that GCCase (71 kDa) is expressed only in citronellate-grown cells, and that MCCase (74 kDa) is expressed in both citronellate-grown and isovalerate-grown cells, is in agreement with the postulated pathway: MCCase as a key enzyme of the Liu pathway is needed in equal measure for catabolism of citronellol, and for catabolism of leucine and isovalerate; GCCase is needed only for utilization of acyclic (mono-) terpenes such as citronellol and geraniol. MCCase can not replace GCCase, since it is specific for methylcrotonyl-CoA, and does not accept geranyl-CoA as a substrate (Fall & Hector, 1977; Hector & Fall, 1976a, b).

To determine whether the key enzymes GCCase and MCCase of the combined pathways are expressed in a similar manner in *P. aeruginosa* and *P. citronellolis*, we performed Western blot analysis for biotin-containing proteins (Fig. 2). Indeed, two biotin-containing polypeptides (74 and 71 kDa) are additionally expressed in citronellate-grown cells compared with glucose-grown cells. Isovalerate-grown cells, however, contain only one additional biotin-containing band (74 kDa) compared with glucose-grown cells. These results show that expression of GCCase and MCCase in *P. aeruginosa* is the same as in *P. citronellolis*. Analysis of the DNA sequences of the biotin-containing subunits of the two candidate carboxylase genes (*liuD* and *atuF*) shows that the deduced amino acid sequences are highly similar (51% identity), and that the polypeptides have almost the same theoretical molecular masses of 71.3 and 71.7 kDa, respectively. A difference of less than 1 kDa is not sufficient to distinguish the products simply by their migration distance in SDS-PAGE. We therefore identified the respective gene products by trypsin fingerprint analysis, and subsequent ESI-MSⁿ sequencing of isolated peptides. This procedure enabled us to assign the bands in biotin blots to the two citronellate-specific biotin-containing proteins AtuF and LiuD (71 and 74 kDa

apparent molecular masses, respectively). This assignment is different from the earlier findings of Diaz-Perez *et al.* (2004).

Considering the results of Diaz-Perez and coworkers (Diaz-Perez *et al.*, 2004), and the findings of this contribution, it is evident that both clusters (*atuABCDEFGH* and *liuABCDE*) are essential for catabolism of methyl-branched compounds such as citronellol, citronellate, leucine and isovalerate. We propose to name the cluster PA2886–PA2893 as the *atu* cluster (acyclic (mono-) terpene utilization, *atuABCDEFGH*), and the PA2011–PA2016 cluster as the *liu* gene cluster (leucine and isovalerate utilization, *liuABCDE*) (Fig. 3). The name *gny* (geranyl), as suggested by Diaz-Perez *et al.* (2004), does not appear to be suitable for the *liu* cluster, since our results clearly show that the *liu* genes are only indirectly involved in the degradation pathway of acyclic terpenes.

Utilization of geraniol apparently requires the presence of additional gene products such as MoeA2, since oxidation of geraniol and/or geraniol, in contrast to oxidation of citronellol, includes a molybdenum-dependent step (Höschle & Jendrossek, 2005). We predict that mutants defective in *liuD*, and probably most mutants defective in one of the other *liu* genes, will be shown to be unable to utilize leucine or isovalerate as a carbon source, in addition to the already known minus phenotype on acyclic monoterpenes (Diaz-Perez *et al.*, 2004).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank A. Jakob for performing trypsin fingerprint and LC-MS analyses.

REFERENCES

- 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, 151–156.
- Burke, Y. D., Ayoubi, A. S., Werner, S. R., McFarland, B. C., Heilman, 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, 3127–3134.
- 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.
- Carnescchi, S., Bradaia, A., Fischer, B., Coelho, D., Scholler-Guinard, M., Gosse, F. & Raul, F. (2002a). Perturbation by geraniol of cell membrane permeability and signal transduction pathways in human colon cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther* 303, 711–715.
- Carnescchi, S., Langley, K., Exinger, F., Gosse, F. & Raul, F. (2002b). Geraniol, a component of plant essential oils, sensitizes human colon cancer cells to 5-fluorouracil treatment. *IARC Sci Publ* 156, 407–409.
- Carnescchi, S., Bras-Goncalves, 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, 53–59.
- Diaz-Perez, A. L., Zavala-Hernandez, A. N., Cervantes, C. & Campos-Garcia, J. (2004). The *gnyRDBHAL* cluster is involved in

B. Höschle, V. Gnau and D. Jendrossek

acyclic isoprenoid degradation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* **70**, 5102–5110.

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**, 1739–1747.

Fall, R. R. (1981). 3-Methylcrotonyl-CoA and geranyl-CoA carboxylases from *Pseudomonas citronellolis*. *Methods Enzymol* **71**, 791–799.

Fall, R. R. & Hector, M. L. (1977). Acyl-coenzyme A carboxylases. Homologous 3-methylcrotonyl-CoA and geranyl-CoA carboxylases from *Pseudomonas citronellolis*. *Biochemistry* **16**, 4000–4005.

Fall, R. R., Brown, J. L. & Schaeffer, T. L. (1979). Enzyme recruitment allows the biodegradation of recalcitrant branched hydrocarbons by *Pseudomonas citronellolis*. *Appl Environ Microbiol* **38**, 715–722.

Hector, M. L. & Fall, R. R. (1976a). Multiple acyl-coenzyme A carboxylases in *Pseudomonas citronellolis*. *Biochemistry* **15**, 3465–3472.

Hector, M. L. & Fall, R. R. (1976b). Evidence for distinct 3-methylcrotonyl-CoA and geranyl-CoA carboxylases in *Pseudomonas citronellolis*. *Biochem Biophys Res Commun* **71**, 746–753.

Hierro, I., Valero, A., Perez, P., Gonzalez, P., Cabo, M. M., Montilla, M. P. & Navarro, M. C. (2004). Action of different monoterpenic compounds against *Anisakis simplex* s.l. L3 larvae. *Phytomedicine* **11**, 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**, 2277–2283.

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**, 519–522.

Pawar, P. V., Sharma, R. N., Phadnis, A. P., Nanda, B. & Patwardhan, S. A. (1991). Action of some insect growth regulators on mosquito vectors: part I – citronellol based diethers. *J Commun Dis* **23**, 118–122.

Rice, P. J. & Coats, J. R. (1994). Insecticidal properties of several monoterpenoids to the house fly (*Diptera: Muscidae*), red flour beetle (*Coleoptera: Tenebrionidae*), and southern corn rootworm (*Coleoptera: Chrysomelidae*). *J Econ Entomol* **87**, 1172–1179.

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 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-isohexenylglutaconyl-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 isoprenoid compounds. II. The role of carbon dioxide. *Biochem Z* **338**, 245–264.

Seubert, W., Fass, E. & Remberger, U. (1963). Studies on the bacterial degradation of isoprenoid compounds. III. Purification and properties of geranyl carboxylase. *Biochem Z* **338**, 265–275.

Simon, R., Priefer, U. & Pühler, A. (1983). A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Bio/Technology* **1**, 784–791.

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

Appendix 3

Submitted to Microbiology (November, 2005)

**The *Pseudomonas aeruginosa* gene clusters
atuABCDEFGH and *liuRABCDE* encode proteins of the
acyclic terpene utilisation pathway (Atu) and of the
leucine/isovalerate utilisation (Liu) pathway, respectively**

Birgit Höschle¹, Wolfgang Armbruster², and Dieter Jendrossek^{1*}

¹Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart, Germany

²Institut für Lebensmittelchemie, Universität Hohenheim, Stuttgart,
Germany

Key words: Citronellol geraniol, branched-chain carbon metabolism, *aeruginosa*,
putida, *fluorescens*

*Correspondent footnote: Dieter Jendrossek

Institut für Mikrobiologie

Universität Stuttgart

Allmandring 31

70550 Stuttgart

Germany

Tel.: +49-711-685-5483

Fax: +49-711-685-5725

E-mail: dieter.jendrossek@imb.uni-stuttgart.de

Summary

A putative isohexenyl-glutaconyl-CoA hydratase gene (*atuE*) of a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 gene cluster comprising of eight genes (*atuABCDEFGH*) was identified to be necessary for acyclic terpene utilisation (Atu) such as citronellol or geraniol by transposon-based mutant analysis. A second gene cluster (*liuRABCDE*) that was previously assumed to encode the genes of the citronellol-degrading pathway was identified to code for genes of the leucine/isovalerate-utilising (Liu) pathway by insertion mutagenesis. Mutants in the Liu cluster (*liuC*, *liuD*) were unable to utilise acyclic monoterpenes and leucine or isovalerate. Insertion mutants in the Atu cluster (*atuE*, *atuF*) were still able to grow on leucine or isovalerate as a carbon source but growth on citronellol was abolished. This indicated a functional Liu pathway and a defective Atu pathway in Atu mutants. Key enzymes of the Atu and Liu pathways are geranyl-CoA carboxylase (GCCase; encoded by *atuC*, *atuF*) and methylcrotonyl-CoA carboxylase (MCCase; *liuB*, *liuD*). Citronellate-grown cells of *P. aeruginosa* wild type contained GCCase and MCCase activities but isovalerate-grown cells contained only MCCase activity. MCCase was not detectable in Western blots in *liuD* insertion mutant. In *atuF* insertion mutant, however, only GCCase activity was abolished while MCCase was still detectable in isovalerate- and in citronellate-exposed cells. Inspection of the genome sequences of other sequenced pseudomonads (*Pseudomonas putida* KT 2240, *Pseudomonas fluorescens* Pf-5, *Pseudomonas syringae tomato* DC3000) revealed candidate genes of the Liu pathway for all strains analysed but Atu genes were found only in *P. fluorescens* Pf-5. This result concurred with the finding that *P. fluorescens* Pf-5 was the only strain besides *P. aeruginosa* capable to utilise citronellol as a sole source of carbon and energy while all four strains were able to utilise isovalerate and leucine as carbon sources.

Introduction

Linear terpenes such as citronellol and geraniol are aroma compounds frequently occurring in plants. Citronellol (3,7-dimethyl-6-octen-1-ol) is used in food (aroma, flavour) and perfume industry (odour) but is also used as a natural repellent of mosquitoes. 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 (see Fig. 1). 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 methyl-branched carbon backbone.

The degradation pathway of acyclic (mono-) terpenes such as citronellol or geraniol has been investigated in *Pseudomonas citronellolis* by Seubert and co-workers in the 60th and by Fall and co-workers in the 70th of the last century (Fall & Hector, 1977; Fall *et al.*, 1979; Fall, 1981; Seubert, 1960; Seubert *et al.*, 1963; Seubert & Remberger, 1963; Seubert & Fass, 1964a; Seubert & Fass, 1964b). In principle, terpene alcohols are oxidized and activated to the corresponding CoA thioesters, the β -methyl groups are carboxylated by geranyl-CoA carboxylase (GCCase) and the resulting acetate function is cleaved off from the carbon backbone. The remaining molecule is degraded by β -oxidation (for details see Fig. 1). The acyclic terpene utilisation pathway (Atu) enters the leucine/isovalerate utilising pathway (Liu) on the level of methylcrotonyl-CoA and involves another carboxylase, methylcrotonyl-CoA carboxylase (MCCase). MCCase differs from GCCase in its substrate specificity (Fall & Hector, 1977; Hector & Fall, 1976a). Most of the previous work had been done with *P. citronellolis*. Studies of Fall and co-workers suggested that utilisation of acyclic terpenes is the same or very similar to *P. citronellolis* in the closely related *Pseudomonas aeruginosa* and probably in *Pseudomonas mendocina* (Cantwell *et al.*, 1978; Fall *et al.*, 1979).

In contrast to the understanding of the catabolic pathway of acyclic monoterpenes the knowledge on the corresponding genes has been poor until recently. A gene cluster comprising of 6 genes (*gnyRDBHAL* [PA2011 to PA2016]) had been found to be necessary for degradation of linear terpenes in *P. aeruginosa*

(Diaz-Perez *et al.*, 2004). Insertion mutagenesis in 5 of the 6 genes resulted in inability of the respective to utilise citronellol, geraniol and related linear terpenes. Recent studies of our lab revealed that the *gny* cluster is also necessary for leucine and isovalerate utilisation (Liu) but is only indirectly involved in acyclic (mono-)terpenes utilisation (Atu) (Höschle *et al.*, 2005). We therefore renamed the *gny* gene cluster as *liu* cluster (leucine and isovalerate utilisation) and proposed a different name for genes directly involved in acyclic terpene utilisation (*atu* genes). In this study, we continued our studies on utilisation of acyclic terpenes (citronellol, geraniol) and other methyl-branched compounds (leucine, isovalerate). We were able to confirm conclusions based on biochemical studies by independent analysis of selected genes of the *atu* and *liu* gene clusters.

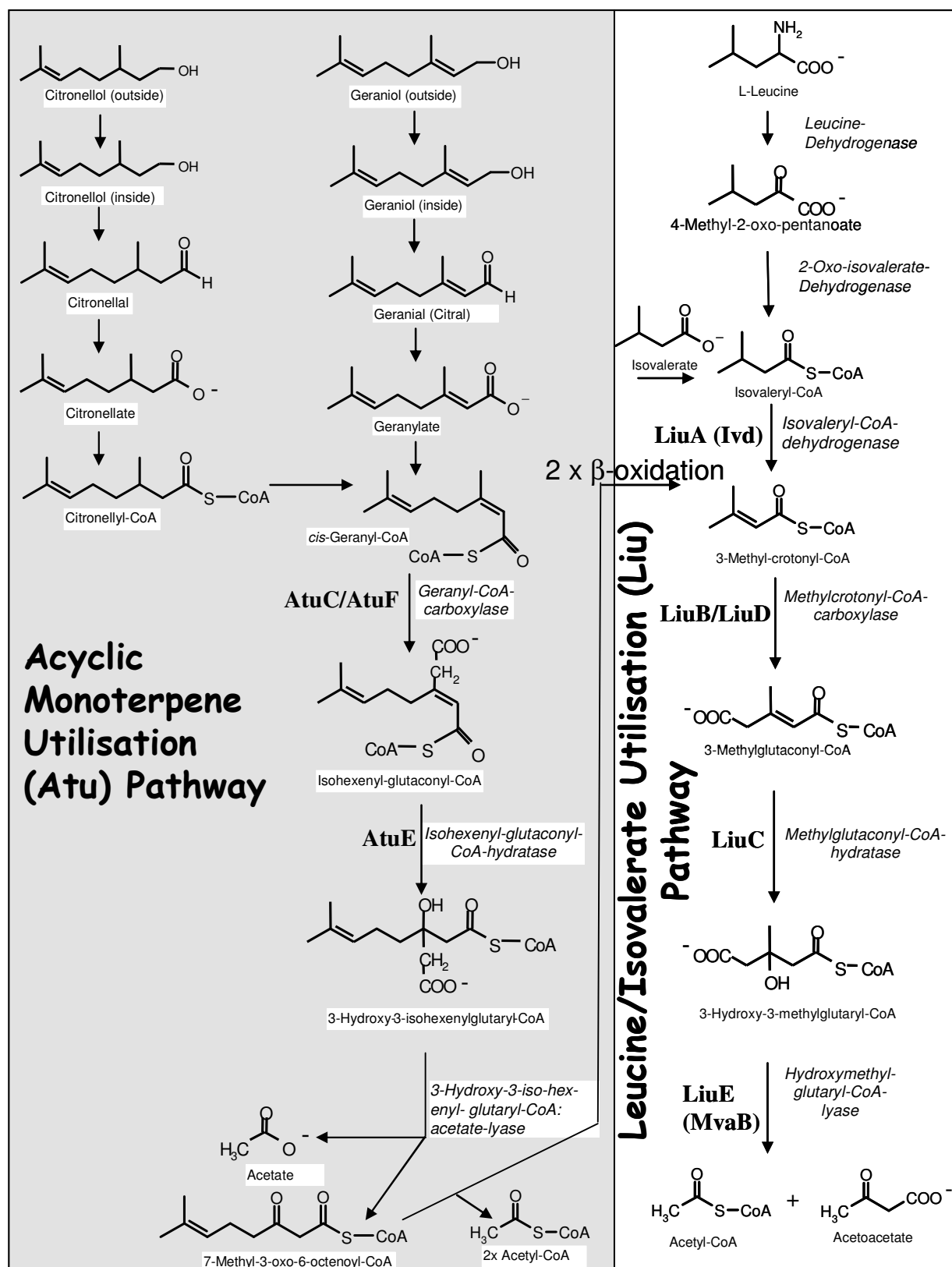


Fig. 1: Putative acyclic (mono-) terpenes utilisation (Atu) and leucine/isovalerate utilisation (Liu) pathway according to (Seubert & Fass, 1964b), modified from (Höschle *et al.*, 2005).

Methods

Bacterial strains, plasmids and culture conditions

The bacterial strains and plasmids used in this study are shown in Table 1. Cultures of *P. aeruginosa* PAO1 were routinely grown in Luria-Bertani (LB) media or in mineral salt medium (Schlegel *et al.*, 1961) containing different carbon sources (0.1% [v/v] sodium citronellate, 0.1% [v/v] sodium geranylate and 0.1% [v/v] sodium isovalerate) at 30°C. Water-insoluble carbon sources (citronellol, geraniol) were added in the space between the petri dish and the agar (20 µL 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. Liquid cultures contained 0.5% glucose or 0.1% glucose and 0.2% of sodium citronellate and 0.2% sodium isovalerate, respectively. *E. coli* strains were grown in Luria-Bertani media at 37°C.

Table 1: Strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Reference or source
<i>Escherichia coli</i> JM109	Cloning strain	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
<i>E. coli</i> S17-1	Mobilizing strain, <i>tra</i> ⁺	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Wild type; C+ G+ CS+ GS+	ATCC 15692
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5	Wild type; C+ G- CS+ GS-	NRRL B-23932 (Paulsen <i>et al.</i> , 2005)
<i>P. aeruginosa</i> PAO1 Sm ^R	Spontaneous streptomycin-resistant mutant of PAO1 (≥ 500µg/ml), Sm ^r	(Höschle & Jendrossek, 2005)
<i>P. aeruginosa</i> PAO1 Sm ^R #22B/1/1 (<i>atuE</i> ::mini-Tn5)	Transposon mutant of PAO1; Tc ^r transposon inserted within <i>atuE</i>	This study
<i>P. aeruginosa</i> PAO1 Sm ^R ins- <i>liuD</i>	Knockout mutant in <i>liuD</i> with pKnockout-G:: <i>liuD</i> in the genome; Sm ^r , Gm ^r	This study
<i>P. aeruginosa</i> PAO1 Sm ^R ins- <i>liuC</i>	Knockout mutant in <i>liuC</i> with pKnockout-G:: <i>liuC</i> in the genome; Sm ^r , Gm ^r	This study
<i>P. aeruginosa</i> PAO1 Sm ^R ins- <i>atuF</i>	Knockout mutant in <i>atuF</i> with pKnockout-G:: <i>atuF</i> in the genome; Sm ^r , Gm ^r	(Höschle <i>et al.</i> , 2005)
pUT miniTn5-Tc	Mutagenesis plasmid; Tc ^r	(de Lorenzo <i>et al.</i> , 1990)
pKnockout-G	Suicide vector for rapid gene inactivation in <i>P. aeruginosa</i>	(Windgassen <i>et al.</i> , 2000)
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

Transposon mutagenesis

P. aeruginosa PAO1 Sm^r and *E. coli* S17-1 containing the pUTminiTn5-Tc plasmids were grown in NB medium and Luria-Bertani medium, respectively. Equal volumes of the donor and of the recipient culture were mixed and spotted onto a NB agar plate and incubated over night at 30°C. The cells were resuspended in 3 mL of 10 mM MgSO₄, plated on selection agar containing the appropriate amounts of antibiotics (500 µg streptomycin mL⁻¹ and 50 µg tetracycline mL⁻¹) and incubated for 2 days at 30°C. Selected transconjugants were screened for utilisation of different carbon sources.

Identification and sequencing of transposon insertion fragments.

*Pst*I or *Xho*I-digested genomic DNA of selected transconjugants was analysed by Southern blot hybridization with a DIG-labelled PCR probe (forward primer: 5'-AATGCGCTCA-TCGTCATCCT-CGG-3'; backward primer: 5'-CGATCCTTGA-AGCTGTCCCT-GA -3') specific for the tetracycline resistance gene of the pUT miniTn5-Tc plasmid. Tn5-Tc-containing DNA fragments with the size of interest ± 0.5 kbp were isolated from agarose gel, cloned in *Pst*I or *Xho*I digested pBluescript SK⁺ and transformed into *E. coli* JM109. Clones with plasmids harbouring the miniTn5-Tc fragment were selected on LB-plates containing 12 µg tetracycline mL⁻¹. Sequencing of the isolated recombinant plasmids containing the mini-Tn5-Tc fragment was done with the synthetic oligonucleotides specific for the respective I- and O-ends (5'-AGTGAGGGTT-TGCAACTGC-3' and 5'-TTAAGCGTGC-ATAATAAGC-3') and the T3- and T7-primers specific for the multiple cloning site of the pBluescript SK⁺ vector. The mini-Tn5-Tc insertion site of the respective mutant was identified by comparison of the obtained DNA sequences with the updated database of the pseudomonas genome project (www.pseudomonas.com).

Insertion mutagenesis

Disruption of *liuD* (PA2012) and *liuC* (PA2013) were carried out using pKnockout-G for rapid gene inactivation in *P. aeruginosa* (Windgassen *et al.*, 2000). 3'- and 5'-truncated fragments of *liuD* and *liuC* were obtained by PCR mediated amplification of the open reading frames *liuD* and *liuC* from *P. aeruginosa* genomic DNA using the synthetic oligonucleotides *liuD*-*Xba*I-Fw (5'-GCTCTAGAGC-CGCGTATGCT-GGTGGAGAAA-TACC - 3') and *liuD*-*Xba*I-Rev (5'-GCTCTAGAGC-GAACCCGGTG-

TCCAGTTCGG- 3') as *liuD* specific primers and *liuC-EcoRI-Fw* (5' – GGAATTCCCA-TCGCCGAACT-CATGACCCAT-C - 3') and *liuC-EcoRI-Rev* (5' – GGAATTCCGG-CGGGACAGCT-TTCGCTGAG - 3') for *liuC*-specific primers. The *XbaI*-digested purified 750 bp PCR fragment of *liuD* was cloned in the *XbaI*-site of pKnockout-G and transformed in *E. coli* S17-1. The *EcoRI*-digested purified 322 bp PCR fragment of *liuC* was cloned in the *EcoRI*-site of pKnockout-G and transformed in *E. coli* S17-1. The plasmids pKnockout-G::*liuD* and pKnockout-G::*liuC* were transferred to *P. aeruginosa* PAO1 Sm^r via conjugation and selection on LB agar containing 500 µg streptomycin mL⁻¹ and 50 µg gentamycin mL⁻¹. The disruption of *liuD* and *liuC* were verified by PCR using one *liuD*- and *liuC*-specific primer, respectively and one pKnockout-specific primer. Additionally, Southern blot hybridisation of chromosomal mutant DNA with a DIG-labelled probe specific for the gentamycin resistance gene and a DIG-labelled probe specific for *liuD* and *liuC* confirmed the success of insertion mutagenesis.

Synthesis of geranyl-CoA

Synthesis of geranyl-CoA was done by the mixed-anhydride method described elsewhere (Guan *et al.*, 1999). 770 µmol of geranic acid were dissolved in 5.1 ml tetrahydrofuran and neutralized by adding an equimolar amount of triethylamine. 770 µmol of ethylchloroformate were added and the mixture was stirred for 30 min at room temperature before the solution was filtered through a filter with 4 µm pore size. The filtrate containing the anhydride was added drop wise to 29 µmol coenzyme A (CoA) that had been dissolved in 12 ml water to tetrahydrofuran 3:2, pH 8.0 (with solid NaHCO₃). After stirring for 25 min, 4 ml of water were added and the pH was adjusted to 3.0 with 2N HCl. To remove remaining mixed anhydride the solution was extracted 3 times with diethyl ether. The aqueous phase was dried by lyophilisation. Successful synthesis of geranyl-CoA was confirmed by detection of the predicted masses by HPLC-MS ESI-analysis. CoA was purchased from GERBU and methylcrotonyl-CoA from Sigma.

Determination of GCase and MCase activity

Late exponential cells (carbon sources as indicated in the text) were collected by centrifugation at 4°C and washed with mineral salt medium without carbon source. The pellet was resuspended in 1 mL of 25 mM Tris-HCl, pH 7.5 per g cells. The suspension was passed two times through a French press cell at 800 psi. Cell debris

and membrane fragments were removed by centrifugation at 80.000 *g* in a Beckman rotor Ti50 for 1 hour at 4 °C. The supernatant was used for further analysis. Activities of GCase and MCase were measured by the decrease of NADH concentration at 340 nm (30 °C) in a coupled enzymatic assay described by Fall (Fall, 1976). The assay mixture contained (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 BSA, 6.3 U mL⁻¹ pyruvate-kinase, 13.0 U mL⁻¹ lactate-dehydrogenase and 15-80 µL of soluble crude extract. The assay was started by adding 5 µL of 20 mM methylcrotonyl-CoA (MCase) or 40 µL of geranyl-CoA 20 mg mL⁻¹ (GCase). One unit of activity is defined as 1 µmol of product formed per minute.

HPLC-(ESI)MS determination of CoA compounds

LC-(ESI)MS was run on an HPLC on an HP1100 HPLC-system (Agilent, Waldbronn,, Germany), which comprised an HP1100 autosampler, HP1100 gradient pump, HP1100 column thermoregulator, and HP1100 diode array detector (DAD) module, coupled with a Micromass VG platform II quadrupole mass spectrometer equipped with an electrospray (ESI) interface. Chromatographic conditions were as follows: column, Hypersil gold C18 1,9 µ (Thermo electron) 50 x 2.1 mm; column temperature 25 °C, flow rate 0.2 ml/min; injection volume 5 µl; eluent mixtures (A) 10 mmol ammoniumformiat /MeOH 98 + 2 (V/V), (B) acetonitril; gradient: % B (t[*min*]) 3 (0-3) – 100 (20-24). MS parameters were as follows: ESI-; source temperature 120 °C, capillary 3.0 kV; HV lens 0.5 kV; cone voltage 50 V. The MS system was operated in full scan (*m/z* 300 – 1000) For data acquisition and processing, the MassLynx 3.2 software was used.

Isolation of biotin-containing proteins and Western-blot analysis

Isolation of biotin-containing proteins from soluble cell extracts was done with immobilized monomeric avidin. A small column was packed with 250 µL immobilized monomeric avidin and equilibrated with phosphate buffered saline (PBS) containing 0.1 M phosphate buffer, 0.15 M NaCl, pH7.0. 250 µL of the crude extract were applied to the column. The column was washed 6 times with one volume of PBS. Biotin-containing proteins were eluted from the column with elution buffer (2 mM D-biotin in PBS). The column was regenerated by washing two times with 0.1 M glycine-HCl, pH 2.8. Samples were separated by 10% SDS-PAGE and either stained with Coomassie blue or transferred to PVDF membranes for Western-blot analysis.

Western-blotting was done by standard procedure. The blotted biotin-proteins were tagged with Streptavidin-AP conjugate (Roche, Mannheim) and the colour development was done with nitroblue-tetrazoliumchloride (NBT) and 5-bromo-4-chloro-3-indoyl-phosphate-*p*-tolodium salt (BCIP). Prestained dual colour SDS-PAGE standard proteins (BioRad) were used as marker proteins.

Results

Mini-Tn5-based transposon mutagenesis was performed with *P. aeruginosa* PAO1 as described in materials and methods. Mutants obtained were tested for their ability to utilise citronellol, geraniol, citronellate and geranylolate. Out of about 8500 mutants tested, one mutant (#22B-1-1) was unable to grow on any of the 4 monoterpenes tested. Growth of this mutant on acetate, succinate, glucose or NB medium could not be differentiated from the wild type indicating that the mutation could be specific for metabolism of acyclic terpenes. The mini-Tn5-containing DNA-fragment of mutant #22B-1-1 was cloned and the site of transposon insertion was determined by DNA-sequencing. Mini-Tn5 was inserted at position 3243626 of the *P. aeruginosa* genome (www.pseudomonas.com). This position is located in the coding region of PA2890 (*atuE*), a gene that had been annotated as a putative enoyl-CoA hydratase/isomerase gene. *AtuE* is located within an 8 genes containing cluster PA2886-PA2893 (*atuABCDEFGH*). All of the genes are located close together and have the same orientation of transcription (Fig. 2). Similarities to proteins of the database and possible functions have been suggested to 7 of the 8 putative gene products.

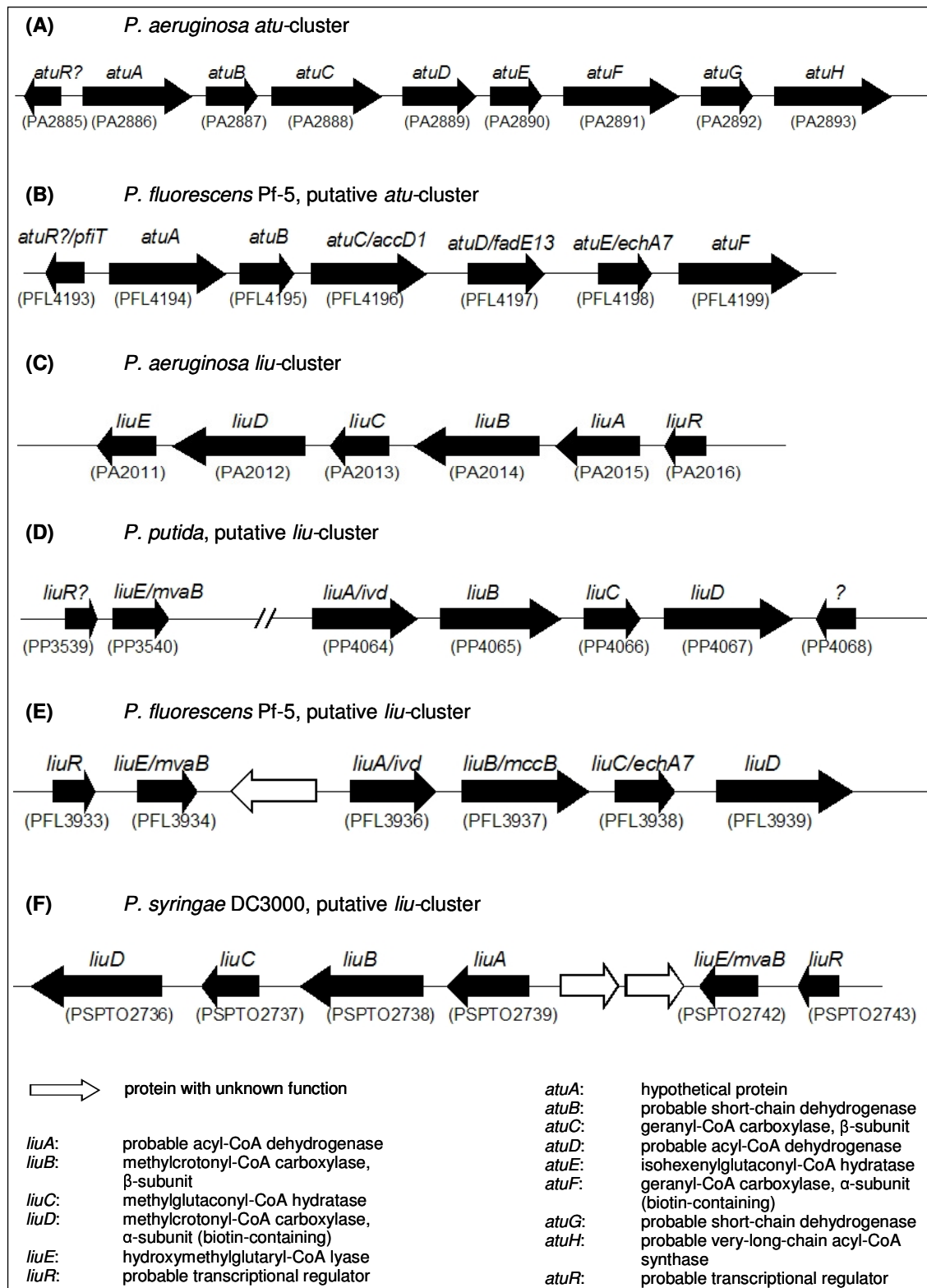


Fig. 2: Comparison of Atu and Liu gene clusters of *P. aeruginosa* PAO1, *P. fluorescens* Pf-5, *P. putida* KT 2240, and *P. syringae* tomato DC3000. Putative functions are given below.

Recently, Diaz-Perez et al., 2004 showed that another gene cluster, *gnyRDBHAL* (corresponding to *liuRABCDE*, PA2011-PA2016 in Fig. 2), was involved in metabolism of citronellol/geraniol because inactivation of several genes of this cluster resulted in a minus phenotype for acyclic terpenes. The authors assumed that this gene cluster encoded functions of the geraniol-degrading pathway. Interestingly, the putative gene products of the cluster identified in this study (*atuABCDEFGH*) showed medium amino acid similarities (33 to 46% amino acid identity) to the gene products of *liuRABCDE* and to potential *liu* genes identified in other sequenced pseudomonads (*P. putida* KT 2240, *P. fluorescens* Pf-5, *P. syringae* tomato DC3000; Table 2; Fig. 2). However, the gene products of *P. aeruginosa liuRABCDE* were significantly more related in amino acid sequence to the corresponding postulated *liu* genes of *P. putida*, *P. fluorescens* and *P. syringae* (67 to 89% identity) than to *atuABCDEFGH* gene products (33 – 46%). In addition, *atuABCDEFGH* gene products of *P. aeruginosa* showed very high sequence similarity to a gene cluster of *P. fluorescens* (75 to 91%). No high sequence similarity (identity > 50%) of the *atu* gene products of *P. aeruginosa* was found to any genes of *P. putida* and *P. syringae*. The latter two organisms were able to utilise leucine and isovalerate as carbon sources but they were unable to grow with citronellol as a sole source of carbon and energy. Since *P. fluorescens* Pf-5 contained most candidate genes of the *atu* and *liu* cluster we speculated that *P. fluorescens* could be able to utilise monoterpene alcohols as a sole source of carbon source. Indeed, *P. fluorescens* Pf-5 grew well on citronellol and citronellic acid but only poor if at all on geraniol and geranylate. Thus, *P. fluorescens* Pf-5 is the fourth species besides *P. citronellolis*, *P. aeruginosa* and *P. mendocina* that is able to utilise citronellol. Our results indicate that the *atu* genes are essential for citronellol utilisation and that catabolism of citronellol and geraniol probably is at least partially different.

Table 2: Amino acid similarities of *P. aeruginosa* Liu proteins with other proteins of related species. Values indicate percent of identical amino acids. Annotated possible functions according to database are also given.

	<i>P. putida</i> KT 2240	<i>P. fluorescens</i> Pf-5	<i>P. syringae</i> tomato str. DC3000	<i>P. aeruginosa</i> PAO1
LiuE (PA2011)	LiuE (MvaB) (PP3540) Hydroxymethylglutaryl-CoA-lyase 78%	LiuE (MvaB) (PFL3934) Hydroxymethylglutaryl-CoA-lyase 78%	LiuE (MvaB) (PSPTO2742) Hydroxymethylglutaryl-CoA-lyase 73%	PA1217 Probable 2-isopropylmalat-synthase 21%
LiuD (PA2012)	LiuD (PP4067) Acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxylase, putative 76%	LiuD (PFL3939) Biotin carboxylase, biotin-containing subunit 74%	LiuD (PSPTO2736) Biotin carboxylase, biotin-containing subunit 72%	AtuF (PA2891) Probable biotin carboxylase/biotin carboxyl carrier protein 51%
LiuC (PA2013)	LiuC (PP4066) Enoyl-CoA hydratase, putative 67%	LiuC (EchA7) (PFL3938) Enoyl-CoA hydratase/isomerase protein family 67%	LiuC (PSPTO2737) Enoyl-CoA hydratase/isomerase protein family 65%	AtuE (PA2890) Probable enoyl-CoA hydratase/isomerase 38%
LiuB (PA2014)	LiuB (PP4065) 3-Methylcrotonyl-CoA-carboxylase, β -subunit, putative 85%	LiuB (MccB) (PFL3937) 3-Methylcrotonyl-CoA-carboxylase, β -subunit 86%	LiuB (PSPTO2738) Carboxyl transferase domain protein 84%	AtuC (PA2888) Probable biotin-dependent carboxylase 44%
LiuA (PA2015)	LiuA (lvd) (PP4064) Isovaleryl-CoA dehydrogenase 87%	LiuA (lvd) (PFL3936) Isovaleryl-CoA dehydrogenase 87%	LiuA (PSPTO2739) Acyl-CoA dehydrogenase, putative 87%	AtuD (PA2889) Probable acyl-CoA dehydrogenase 34%
LiuR (PA2016)	LiuR (PP3539) Transcriptional regulator, putative 85%	LiuR (PFL3933) Transcriptional regulator, MerR family 89%	LiuR (PSPTO2743) Transcriptional regulator, MerR family 82%	-

Table 3: Amino acid similarities of *P. aeruginosa* Atu proteins with other proteins of related species. Values indicate percent of identical amino acids. Annotated possible functions according to database are also given.

	<i>P. putida</i> KT 2240	<i>P. fluorescens</i> Pf-5	<i>P. syringae</i> tomato str. DC3000	<i>P. aeruginosa</i> PAO1
AtuR (PA2885)	PP3756 Transcriptional regulator, TetR family 31% PP3960 Transcriptional regulator, TetR family 25%	AtuR (PfiT) (PFL4193) Transcriptional regulator I2 82% PFL2165 Transcriptional regulator, TetR family 28%	-	PA1242 Probable transcriptional regulator 44%
AtuA (PA2886)	-	AtuA (PFL4194) Conserved hypothetical protein 79% PFL4358 Conserved hypothetical protein 37%	-	-
AtuB (PA2887)	PP1817 Oxidoreductase, short-chain dehydrogenase/reductase family 33%	AtuB (PFL4195) Oxidoreductase, short-chain dehydrogenase/reductase family 84% PFL1756 Oxidoreductase, short-chain dehydrogenase/reductase family 33%	PSPTO1056 Oxidoreductase, short-chain dehydrogenase/reductase family 36%	PA1649 Probable short-chain dehydrogenase 33%
AtuC (PA2888)	LiuB (PP4065) 3-Methylcrotonyl-CoA-carboxylase, β -subunit, putative 44%	AtuC (PFL4196) Propionyl-CoA carboxylase, β -subunit 82% LiuB (MccB) (PFL3937) 3-Methylcrotonyl-CoA-carboxylase, β -subunit 45%	LiuB (PSPTO2738) Carboxyl transferase domain protein 45%	LiuB (PA2014) Methylcrotonyl-CoA carboxyltransferase, β -chain 46%
AtuD (PA2889)	LiuA (Ivd) (PP4064) Isovaleryl-CoA dehydrogenase 35%	AtuD (FadE13) (PFL4197) 91% LiuA (Ivd) (PFL3936) Isovaleryl-CoA dehydrogenase 36%	LiuA (PSPTO2739) Acyl-CoA dehydrogenase, putative 37%	PA4435 Probable acyl-CoA dehydrogenase 40% LiuA (PA2015) Probable acyl-CoA dehydrogenase 36%

AtuE (PA2890)	LiuC (PP4066) Enoyl-CoA hydratase, putative 37%	AtuE (EchA7) (PFL4198) Enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein 75% LiuC (PFL3938) Enoyl-CoA hydratase/isomerase protein family 38%	LiuC (PSPTO2737) Enoyl-CoA hydratase/ isomerase protein family 40%	LiuC (PA2013) Probable enoyl- CoA hydratase/isomer- ase 39%
AtuF (PA2891)	LiuD (PP4067) Acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxylase, putative 51%	AtuF (PFL4199) Biotin carboxylase/biotin- containing subunit 70% LiuD (PFL3939) Biotin carboxylase, biotin-containing subunit 50%	LiuD (PSPTO2736) Biotin carboxylase, biotin-containing subunit 50%	LiuD (PA2012) Methylcrotonyl- CoA carboxylase, α -chain (biotin- containing) 51%
AtuG (PA2892)	PP4148 Peptide ABC transporter, permease protein 32%	PFL1850 Oxidoreductase, short- chain dehydrogenase/ reductase family 32%	PSPTO2396 Oxidoreductase, short chain dehydrogenase/ reductase family 36%	PA0182 Probable short- chain dehydrogenase 37%
AtuH (PA2893)	PP0763 Medium-chain-fatty- acid CoA ligase 24%	FadD6 (PFL4344) 50%	PSPTO2150 Putative pyoverdine sidechain peptide synthetase IV, D-Asp-L-Ser component 25%	PA4198 Probable AMP- binding enzyme 27%

LiuC and *atuE* both had been annotated as putative enoyl-CoA hydratase/isomerase genes. The *Atu* and *Liu* pathway each include one hydratase step, namely isohexenyl-glutaconyl-CoA-hydratase and methylglutaconyl-CoA hydratase (Fig. 1). We assumed that *atuE* and *liuC* could encode isohexenyl-glutaconyl-CoA-hydratase and methylglutaconyl-CoA hydratase of the *Atu* and *Liu* pathway, respectively. We constructed an insertion mutant in *liuC* as described in materials and methods and determined its phenotype. The *ins-liuC* mutant had the same citronellol/geraniol/geranylate minus phenotype as the *ins-atuE* mutant (22B-1-1). On citronellate, growth was strongly reduced compared to the wild type but some residual growth occurred upon incubation at 30°C for 1 week. Growth on glucose, succinate and acetate was not affected. To determine, which of the two genes (*atuE* vs *liuC*) codes for isohexenyl-glutaconyl-CoA-hydratase of the *Atu*

pathway and which for methylglutaconyl-CoA hydratase of the Liu pathway, we tested growth of the mutants and of the wild type on leucine and isovalerate. The wild type and the *atuE* mutant showed comparable good growth on leucine and isovalerate within 4 days (30°C) indicating that *AtuE* is not necessary for utilisation of leucine or isovalerate. However, the *liuC* mutant was unable to utilise leucine or isovalerate as sole source of carbon and energy confirming that *LiuC* is necessary for utilisation of leucine and isovalerate. Our results indicate that *atuE* encodes a protein of the *Atu* pathway (isohexenyl-glutaconyl-CoA-hydratase) and that *liuC* encodes a protein of the *Liu* pathway (methylglutaconyl-CoA hydratase). This assignment is different to that proposed by Diaz-Perez and co-workers (Diaz-Perez *et al.*, 2004). To find independent evidence for our assumption insertional mutagenesis of *atuF* and *liuD* was performed. Both genes code for putative biotin-containing subunits of carboxylases. According to our assumption *atuF* should represent the GCase biotin-subunit gene (carboxylase of the *Atu* pathway) and *liuD* should encode the MCCase biotin-subunit (carboxylase of the *Liu* pathway). Insertional mutagenesis was performed as described in materials and methods. Insertion mutants in *atuF* and *liuD* grew normally on unrelated carbon sources (glucose, succinate, NB) but were unable to utilise citronellol, geraniol, citronellate and geranylate. However, only mutant ins-*liuD* was unable to utilise leucine or isovalerate while ins-*atuF* grew normally on these compounds. Apparently, *atuF* and *liuD* are necessary for an operating *Atu* and *Liu* pathway, respectively. If it is true, that *atuF* and *liuD* encode GCCase and MCCase, the ins-*atuF* mutant should have no GCCase activity and ins-*liuD* should have no MCCase activity. *P. aeruginosa* PAO1 wild type and the two insertional mutants were grown on glucose, citronellate and isovalerate. Isovalerate- and citronellate cultures (each 0.2%) additionally contained 0.1% glucose in order to enable growth of the mutants. MCCase and GCCase activities of soluble cell extracts were performed as described in materials and methods. Methylcrotonyl-CoA was purchased from Sigma and geranyl-CoA was synthesized by the anhydride method. Successful synthesis of geranyl-CoA was confirmed by HPLC-ESI-MS. Geranyl-CoA was identified by 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 (data not shown). None of the strains contained significant MCCase or GCCase activity after growth on glucose. Soluble cell extracts of citronellate-grown wild type cells contained 12 mU/mg and 2 mU/mg MCCase and GCCase activity, respectively indicating that the *Atu* and *Liu* pathways

were both operating. 21 mU/mg MCCase activity but no detectable GCCase activity were determined for isovalerate-grown wild type cells confirming that the Liu pathway is operating in isovalerate-grown cells while the Atu pathway is not functional. Mutant *ins-liuD* contained no or very low (≤ 1 mU/mg) MCCase or GCCase activity after growth in the presence of isovalerate or citronellate, respectively. GCCase activity in the *ins-atuF* mutant was not detectable but significant MCCase specific activities were determined in isovalerate (3 mU/mg) and citronellate-grown cells (2 mU). These results confirm that *liuD* and *atuF* code for MCCase and GCCase, respectively. Biotin-containing proteins of isovalerate-grown cells of the *liuD* mutant and wild type cells were purified by avidin affinity chromatography (Fig. 3). The identities of isolated subunits with LiuB/LiuD and AtuC/AtuF was unequivocally confirmed by trypsin fingerprint mass-spectrometry (Fig. 3) and confirmed that MCCase (LiuB/LiuD) is part of the Liu pathway and GCCase (AtuC/AtuF) is part of the Atu pathway. As expected, LiuD (MCCase biotin subunit) was present both in isovalerate and citronellol-grown wild type cells while AtuF (GCCase biotin subunit) was detected only in citronellol-grown cells. No LiuD signal appeared in the *ins-liuD* mutant. The observed traces of MCCase activity in *liuD* mutant (1 mU/mg) probably corresponded to unspecificity of GCCase (Fall & Hector, 1977; Hector & Fall, 1976a).

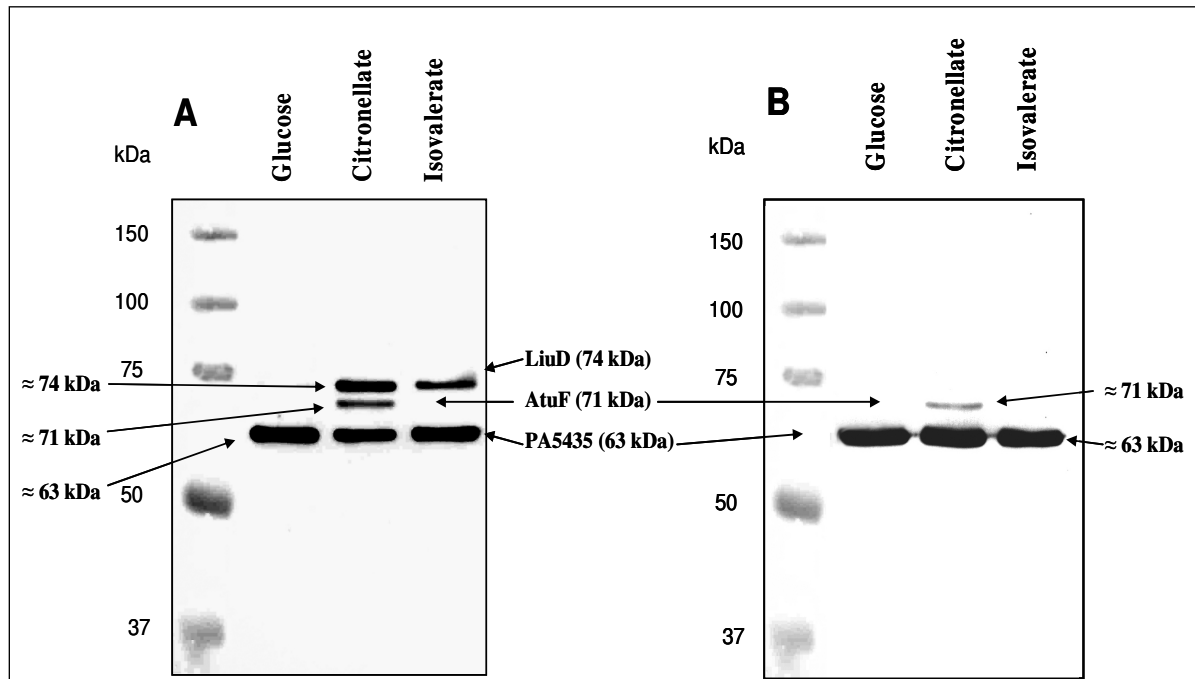


Fig. 3: Western-blot analysis of *P. aeruginosa* PAO1 proteins after SDS-PAGE for biotin-containing proteins. Soluble cell extracts after avidin purification were separated on 10% SDS-polyacrylamide gels (not shown), transferred to PVDF membranes and screened for biotin-containing proteins. To obtain sufficient resolution in the range above 50 kDa electrophoresis was carried out for about 90 min (20-25 mA) so that proteins of less than ≈ 25 kDa had run out of the gel. Gene products identified by trypsin fingerprint-LC-MS analysis of isolated protein bands are indicated. The 74 and 71 kDa proteins were identified as *liuD* and *atuF* gene products while the 63 kDa protein corresponded to a constitutively expressed carboxylase (PA5434). *P. aeruginosa* PAO1 wild type from (Höschle *et al.*, 2005) (A) and *P. aeruginosa liuD* insertion mutant (B).

Discussion

In this study we continued investigation of the catabolism of acyclic (mono-) terpenes in *P. aeruginosa*. A putative pathway leading from citronellol to acetate, acetyl-CoA and acetoacetate as end products based on biochemical investigations in *P. citronellolis* by Seubert and co-workers more than 40 years ago is shown in Fig. 1. The pathway includes 3 phases: (i) Citronellol is oxidized to the corresponding acid, activated to the thioester citronellyl-CoA and subsequently converted to geranyl-CoA. At least one step in the oxidation of geraniol to geranyl-CoA is molybdenum-dependent (probably geranial-dehydrogenase) (Höschle & Jendrossek, 2005). Interestingly, oxidation of citronellol did not require molybdenum indicating separate enzyme(s) for oxidation of citronellol and geraniol. Geranyl-CoA is subsequently carboxylated by GCCase, hydrated and the product is cleaved into acetate and 7-methyl-3-oxo-6-octenoyl-CoA. As a result, the branched methyl group, that would inhibit β -oxidation, is cleaved off as acetate. This biochemical route is named acyclic terpene utilisation (Atu) pathway. (ii) 7-Methyl-3-oxo-6-octenoyl-CoA can be now oxidized by two rounds of β -oxidation without hindrance by β -methyl groups. (iii) The product, 3-methylcrotonyl-CoA, concurs with the leucine/isovalerate utilisation (Liu) pathway that includes a second carboxylation step catalysed by MCCase. GCCase and MCCase have been purified from *P. citronellolis* and were biochemically characterized several decades ago (Fall & Hector, 1977; Hector & Fall, 1976b; Seubert et al., 1963). It came out that both carboxylases consist of two subunits (biotin-containing α -subunit and biotin-free β -subunit) and differ in their substrate specificity. GCCase was rather unspecific and accepted both geranyl-CoA and methylcrotonyl-CoA as a substrate. MCCase was more specific and carboxylated only methylcrotonyl-CoA in in vitro experiments. MCCase was expressed in citronellate- and in isovalerate-grown cells, while GCCase was only expressed in the presence of linear terpenes (citronellol, citronellate). Since isovalerate-grown cells of *P. aeruginosa* contained significant MCCase activity but no detectable GCCase activity we conclude that *P. aeruginosa* MCCase also does not accept geranyl-CoA as a substrate. Acetyl-CoA, acetate and acetoacetate are the end products of the combined pathways. While the Atu pathway presumably is only present in citronellol-degrading bacteria (*P. citronellolis*, *P. aeruginosa*, *P. mendocina*, *P. fluorescens* Pf-5) the Liu pathway probably is present in many organisms at least in leucine- and isovalerate-utilising bacteria.

Table 2 contains an overview of potential *liu* genes in genomes of sequenced *Pseudomonas* species.

In this and our previous study (Höschle *et al.*, 2005) we identified *atuE* and *atuF* to be necessary for utilisation of acyclic terpenes and *liuC* and *liuD* to be necessary for an operating Liu pathway by mutant analysis. LiuC and LiuD were only indirectly involved in acyclic terpene utilisation because inactivation of LiuC or LiuD resulted in inability of the cells to utilise leucine and isovalerate in addition to the acyclic monoterpenes minus phenotype. Since growth of the insertion mutants in *atuE* or *atuF* on leucine and isovalerate was unaffected the Liu pathway must be still functional in the two *Atu* mutants. This conclusion is supported by the determination of significant MCCase activity in the GCCase insertion mutant (*ins-atuF*). *AtuE* and *atuF* are part of an 8 genes containing cluster comprising of *atuABCDEFGH* (Fig. 2). Insertion mutagenesis of *atuF* resulted in the same phenotype as the *atuE* mutant. Because of the close spacing between the individual genes of the cluster we assume that most if not all genes of the cluster represent a transcriptional unit (operon). The other gene cluster (*liuRABCDE*) identified by Diaz-Perez is also necessary for acyclic terpene utilisation. However, because of the inability of the *liuC* and *liuD* mutants to utilise isovalerate and leucine this gene cluster is unlikely to encode the *atu* (formerly *gny*) genes. Moreover, the high similarities of the *liuRABCDE* gene products to several other gene clusters identified in isovalerate-degrading pseudomonads also indicate that *liuRABCDE* encode proteins of the Liu pathway (Table 2). The *liu* gene cluster – in contrast to the *atuABCDEFGH*-cluster - contains putative isovalerate dehydrogenase gene that is the second enzyme of the Liu pathway. Only bacteria, which have both the *atu* and *liu* gene clusters such as *P. aeruginosa* and *P. fluorescens* Pf-5, are able to utilise citronellol. We predict that *P. citronellolis* and *P. mendocina* also will have functional *atu* and *liu* gene clusters. The presence of *atu*-genes in *P. citronellolis* was shown, recently (Förster-Fromme & Jendrossek, 2005).

On the basis of our findings we propose to name the cluster PA2886-PA2893 as *atu* cluster (acylic (mono-) terpene ututilisation, *atuABCDEFGH*) and the PA2011-PA2016 cluster as *liu* gene cluster (leucine and isovalerate ututilisation, *liuRABCDE*) (Fig. 2). Most probably PA2885 encodes a transcriptional regulator and might be involved in regulation of citronellol degradation. We tentatively suggest to name this gene *atuR*; however, we do not have experimental data on *atuR*, yet. Interestingly,

P. fluorescens Pf-5 has a highly similar potential *atuR* gene (82% identity to *atuR* of *P. aeruginosa*). We emphasize that the genes of both clusters (*atu* and *liu*) are not sufficient to confer the ability to utilise acyclic terpenes to other bacteria since transfer of the *atu* cluster to isovalerate-utilising pseudomonads did not result in the ability of the transconjugants to utilise acyclic terpenes as a sole source of carbon and energy (unpublished result). Inspection of the genes of both clusters suggests that at least one gene encoding 3-hydroxy-3-iso-hexenyl-glutaryl-CoA: acetate-lyase is missing. We have so far no evidence whether or not *atuA* could encode the missing lyase gene. In addition, genes necessary for molybdenum cofactor biosynthesis such as *moeA2* (Höschle & Jendrossek, 2005) are indirectly necessary for utilisation of geraniol. In future, we will investigate individual proteins of the *Atu* and *Liu* pathway and assign them to the corresponding genes.

Acknowledgements

We thank Rosi Schäfer for assistance during transposon mutagenesis and A. Jakob for performing trypsin fingerprint analysis.

References

- 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.
- de Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U. & 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.
- 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**, 5102-5110.
- Fall, R. R. (1976).** Stabilization of an acetyl-coenzyme A carboxylase complex from *Pseudomonas citronellolis*. *Biochim Biophys Acta* **450**, 475-480.
- Fall, R. R. & Hector, M. L. (1977).** Acyl-coenzyme A carboxylases. Homologous 3-methylcrotonyl-CoA and geranyl-CoA carboxylases from *Pseudomonas citronellolis*. *Biochemistry* **16**, 4000-4005.
- Fall, R. R., Brown, J. L. & Schaeffer, T. L. (1979).** Enzyme recruitment allows the biodegradation of recalcitrant branched hydrocarbons by *Pseudomonas citronellolis*. *Appl Environ Microbiol* **38**, 715-722.
- Fall, R. R. (1981).** 3-Methylcrotonyl-CoA and geranyl-CoA carboxylases from *Pseudomonas citronellolis*. *Methods Enzymol* **71 Pt C**, 791-799.
- Förster-Fromme, K. & Jendrossek, D. (2005).** unpublished results.
- Guan, X., Diez, T., Prasad, T. K., Nikolau, B. J. & Wurtele, E. S. (1999).** Geranyl-CoA carboxylase: a novel biotin-containing enzyme in plants. *Arch Biochem Biophys* **362**, 12-21.
- Hector, M. L. & Fall, R. R. (1976a).** Multiple acyl-coenzyme A carboxylases in *Pseudomonas citronellolis*. *Biochemistry* **15**, 3465-3472.
- Hector, M. L. & Fall, R. R. (1976b).** Evidence for distinct 3-methylcrotonyl-CoA and geranyl-CoA carboxylases in *Pseudomonas citronellolis*. *Biochem Biophys Res Commun* **71**, 746-753.
- 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 *liuA/liuC* and *atuC/atuF* in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **151**, 3649-3656.
- 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.

Paulsen, I. T., Press, C. M., Ravel, J. & other authors (2005). Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nat Biotechnol* **23**, 873-878.

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 micro-organisms. I. Isolation and characterization of an isoprenoid-degrading bacterium, *Pseudomonas citronellolis* n. sp. *J Bacteriol* **79**, 426-434.

Seubert, W., Fass, E. & Remberger, U. (1963). Studies On The Bacterial Degradation Of Isoprenoid Compounds. III. Purification And Properties Of Geranyl Carboxylase. *Biochem Z* **338**, 265-275.

Seubert, W. & Remberger, U. (1963). Studies On The Bacterial Degradation Of Isoprenoid Compounds. II. The Role Of Carbon Dioxide. *Biochem Z* **338**, 245-264.

Seubert, W. & Fass, E. (1964a). Studies On The Bacterial Degradation Of Isoprenoids. IV. The Purification And Properties Of Beta-Isohexenylglutaconyl-Coa-Hydratase And Beta-Hydroxy-Beta-Isohexenylglutaryl-Coa-Lyase.. *Biochem Z* **341**, 23-34.

Seubert, W. & Fass, E. (1964b). Studies On The Bacterial Degradation Of Isoprenoids. V. The Mechanism Of Isoprenoid Degradation. *Biochem Z* **341**, 35-44.

Simon, R., Priefer, U. & Pühler, A. (1983). A broad host-range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Biotechnology* **1**, 794-791.

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.

Danksagungen

Bei Herrn Prof. Dr. D. Jendrossek möchte ich mich für die Überlassung des Themas, für sein stetiges Interesse am Fortgang der Arbeit, seine ständige Diskussionsbereitschaft und für die gute Betreuung bedanken, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. G. Sprenger danke ich für die Übernahme des Koreferates und für die Möglichkeit, die experimentellen Arbeiten zu dieser Dissertation an seinem Institut anfertigen zu können.

Bei Dr. W. Armbruster (Universität Hohenheim, HPLC-MS), Dr. V. Gnau und A. Jakob (Universität Tübingen, Trypsin-Fingerprint), sowie Simone Reinhardt (Universität Stuttgart, Klonierungen) bedanke ich mich für ihre Hilfe, Anregungen und Messzeiten.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei allen Mitarbeitern in Labor 2 für die tolle Arbeitsatmosphäre und den vielen Spaß im Labor. Karin Förster-Fromme danke ich besonders für die gute Zusammenarbeit, für die vielen wissenschaftlichen und vor allem nicht wissenschaftlichen Gespräche und ihre aufmunternden Worte. Weiterhin bedanke ich mich bei allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für die vielen Diskussionen und die stetige Hilfsbereitschaft.

Jan danke ich für seine moralische Unterstützung und dafür, dass er immer für mich da ist.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern, die mich stets unterstützt und mir dieses Studium ermöglicht haben.

Lebenslauf

Birgit Höschle

Geboren am 20. September 1976 in Backnang

1987 – 1996	Heinrich-von-Zügel-Gymnasium, Murrhardt
06/1996	Abitur
10/1996 – 09/2002	Studium der Technischen Biologie (Diplom) an der Universität Stuttgart
09/2002	Diplom Technische Biologie
10/2001 – 09/2002	Diplomarbeit bei Prof. Dr. D. Jendrossek, Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart Thema: „Identifizierung der Gene für den Citronellol- Abbau in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1“
11/2002	Beginn der experimentellen Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit bei Prof. Dr. D. Jendrossek am Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart