

# Vibralacton als Sonde zur Aufklärung der Aktivität und Struktur des ClpP1P2-Komplexes aus *Listeria monocytogenes*\*\*

Evelyn Zeiler, Nathalie Braun, Thomas Böttcher, Andreas Kastenmüller, Sevil Weinkauf und Stephan A. Sieber\*

Unter den Naturstoffen findet sich eine Vielzahl biologisch aktiver Verbindungen mit elektrophilem Grundgerüst, die spezifisch mit nukleophilen Resten, wie Cystein und Serin, im aktiven Zentrum der entsprechenden Enzyme reagieren.<sup>[1-3]</sup> Die Reste sind hauptsächlich für die Katalyse von Reaktionen wichtig und bieten eine maßgeschneiderte Reaktivität gegenüber geeigneten Substraten.<sup>[4]</sup> Wir und andere erforschten bisher die Angriffsziele von monocyclischen  $\beta$ -Lactonen, die sich als potente und selektive Inhibitoren diverser krankheitsrelevanter Enzymklassen herausstellten.<sup>[2,3,5-8]</sup> Im Falle der kovalenten Bindung und Inhibition der caseinolytischen Peptidase ClpP wurde eine drastische Veränderung der Virulenz von Bakterien festgestellt.<sup>[3]</sup> ClpP ist ein zentrales, hoch konserviertes Hitzeschockprotein mit zusätzlichen regulatorischen Funktionen in vielen pathogenen Bakterien.<sup>[9-11]</sup> Einige Organismen, wie *Listeria monocytogenes*, kodieren in ihrem Genom zwei ClpP-Isoformen (ClpP1 und ClpP2), deren Funktion und Struktur noch nicht charakterisiert wurden. Bisher wurde ausschließlich ClpP2 als Angriffsziel der  $\beta$ -Lactone beschrieben.<sup>[2]</sup> Es ist daher mög-

lich, dass es monocyclischen  $\beta$ -Lactonen an entsprechender Reaktivität fehlt, um mit dem nukleophilen aktiven Zentrum von ClpP1 zu reagieren.

In unseren hier vorgestellten Studien haben wir den Rahmen der von Naturstoffen inspirierten  $\beta$ -Lactone zu einem gespannten bicyclischen Ringsystem erweitert, das eine höhere Reaktivität aufweisen könnte. Die Naturstoffe Omuralid, Salinosporamid und Vibralacton (VL) stellen solch ein Strukturgerüst dar und wurden bisher als Proteasom- oder Lipase-Inhibitoren beschrieben.<sup>[12-14]</sup> Wir nutzen hier eine kombinierte Strategie aus Proteomik und biologischer Chemie, genannt „aktivitätsbasiertes Protein-Profilung (ABPP)“,<sup>[15-17]</sup> um nachzuweisen, dass VL, im Unterschied zu monocyclischen  $\beta$ -Lactonen, zu beiden ClpP-Isoformen (ClpP1 und ClpP2) in *L. monocytogenes* eine Affinität aufweist. Außerdem war es in Kombination mit Transmissionselektronenmikroskopie (TEM), Homologie-Modellierung und Strukturvorhersage möglich, die quartäre Struktur des heterooligomeren Komplexes aufzuklären (Abbildung 1).

VL wurde nach Zhou und Smider<sup>[18]</sup> synthetisiert (Schema 1 der Hintergrundinformationen) und im letzten Schritt mit einem Alkinmarker, der die Identifizierung der Angriffsziele durch ABPP ermöglicht, zur Sonde modifiziert (Abbildung 1).<sup>[19]</sup> Dabei wurden zunächst lebende Zellen von *L. welshimeri* und dessen pathogenem Pendant *L. monocytogenes* mit der Vibralactonsonde (VLP) inkubiert. Nach Zellaufschluss wurde das erhaltene Proteom über „Click-Chemie“ (CC)<sup>[20-22]</sup> mit Rhodaminazid behandelt, und die markierten Ziele der Sonde wurden auf einem Fluoreszenzgel (SDS-PAGE) visualisiert (Abbildung 1 der Hintergrundinformationen). Zwei stark fluoreszierende, gleich intensive Banden etwa 20 kDa schwerer Proteine konnten in *L. welshimeri* sowie auch in *L. monocytogenes* (Abbildung 2 A) bis zu einer VLP-Konzentration von 3.4  $\mu$ M (Abbildung 1 C der Hintergrundinformationen) beobachtet werden. Vorinkubation mit verschiedenen Konzentrationen von unmodifiziertem VL führte zur graduellen Auslöschung der Banden, was bedeutet, dass der Naturstoff eine Selektivität für das gleiche Ziel aufweist (Abbildung 2 B). Eine massenspektrometrische (MS-)Analyse ergab, dass die untere Bande ClpP2 entspricht, das von monocyclischen  $\beta$ -Lactonen bereits markiert wurde.<sup>[2]</sup> Die obere Bande entspricht ClpP1, das von keiner anderen  $\beta$ -Lactonsonde als VLP markiert wurde (Abbildung 2 A; Tabelle 1 der Hintergrundinformationen). Während ClpP2-Orthologe von verschiedenen Organismen eine hohe Sequenzhomologie (77% Identität zwischen *L. monocytogenes* und *S. aureus*) und eine tetradecamere, fassartige Anordnung in der Kristallstruktur aufweisen,<sup>[23-26]</sup> teilt ClpP1 nur 41% Identität mit ClpP2 (Abbildung 2 der Hintergrundinforma-

[\*] E. Zeiler, Prof. Dr. S. A. Sieber

Department Chemie, Center for Integrated Protein Science CIPSM, Institute of Advanced Studies IAS, Technische Universität München Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching (Deutschland)

E-Mail: stephan.sieber@tum.de

Dr. N. Braun, A. Kastenmüller, Prof. Dr. S. Weinkauf Center for Integrated Protein Science Munich CIPSM, Department Chemie, Technische Universität München (Deutschland)

Dr. T. Böttcher<sup>[+]</sup>

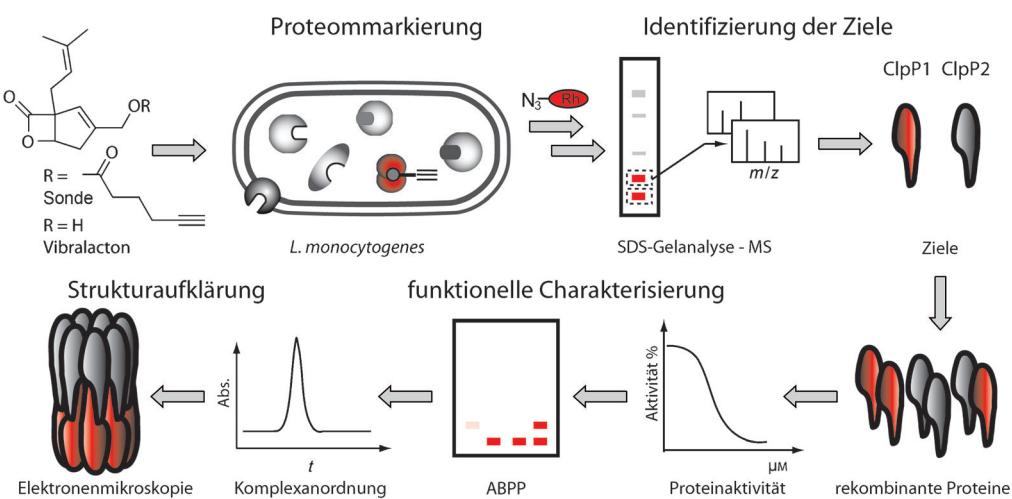
AVIRU, EXIST Forschungstransfer, OC II, Garching (Deutschland)

[+] Aktuelle Adresse:

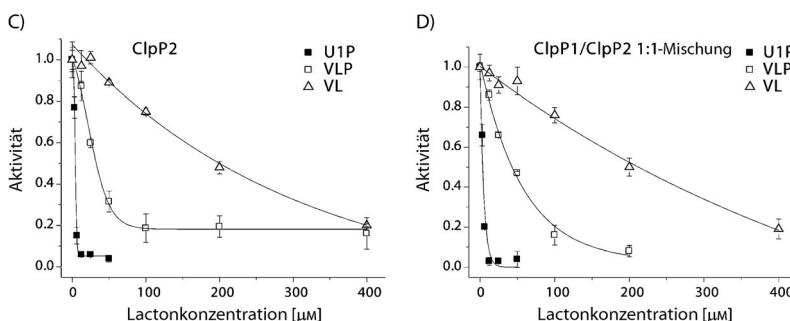
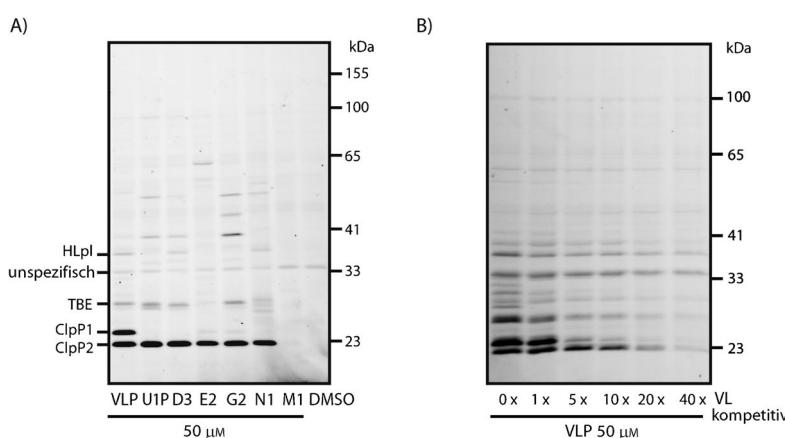
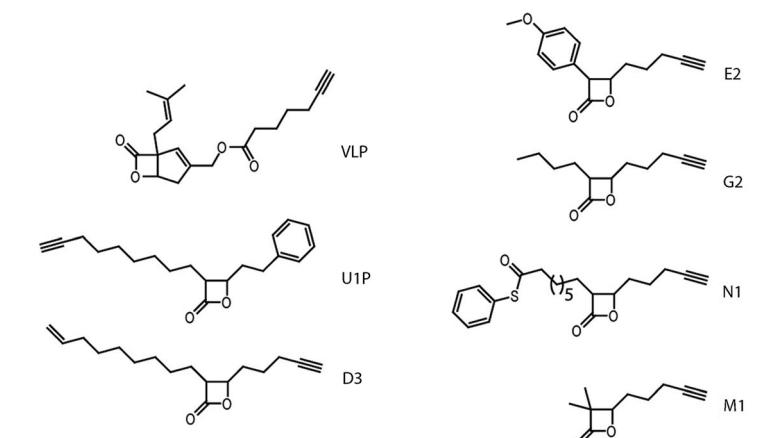
Department of Biological Chemistry and Molecular Pharmacology, Harvard Medical School, Boston, MA (USA)

[\*\*] Wir danken Mona Wolff für exzellente wissenschaftliche Unterstützung und Wolfgang Steglich für hilfreiche Diskussionen. E.Z. wurde vom SFB749 und der TUM-GS gefördert. E.Z. bedankt sich für hilfreiche Ratschläge von Quan Zhou. T.B. wurde von der Studienstiftung des deutschen Volkes und durch einen Exist Forschungstransfer des Bundesministeriums für Wirtschaft und Technologie (BMWI) gefördert. S.A.S. erhielt Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Emmy Noether-Programm), den SFB749, FOR1406, einen ERC starting grant und CIPSM (Center for Integrated Protein Science Munich). S.W. und N.B. wurden gefördert von der DFG (SFB594) und dem CIPSM.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (Details zur Synthese und Charakterisierung der Verbindungen, Bioassays, Elektronenmikroskopie, Bildverarbeitung/3D-Rekonstruktion, Strukturvorhersage, Homologie-Modellierung sowie auch Proteompräparation und -markierung) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201104391> zu finden.



**Abbildung 1.** Schema zur Aufklärung der strukturellen Organisation von ClpP1P2. Die Vibralactonsonde (VLP) wird mit lebenden Zellen inkubiert, und die entsprechenden Ziele werden über SDS-Gelanalyse und MS identifiziert. Funktionelle Studien mit den Hauptzielen ClpP1 und ClpP2 weisen auf eine heterooligomere Anordnung hin, die zusätzlich über Elektronenmikroskopie (EM) bestätigt wurde.



tionen). Dies gab Anlass zur Frage, ob ClpP1 eine unterschiedliche Struktur und Funktion hat und mit ClpP2 zusammen Mischkomplexe bildet, wie es schon für heterooligomere Komplexe unterschiedlicher ClpP-Isoformen beschrieben wurde.<sup>[27]</sup>

Um diese Frage zu beantworten, wurden ClpP1 und ClpP2 sowohl getrennt als auch gemeinsam über ein Koexpressionsvektorsystem in *Escherichia coli* rekombinant überexprimiert. Koexprimiertes ClpP1P2 wurde über einen C-terminalen Strep-Tag an ClpP2 durch Affinitätsäulenchromatographie isoliert, wobei eine Anreicherung von ClpP1 nur möglich war, wenn beide Enzyme einen stabilen heterooligomeren Komplex gebildet hatten. Tatsächlich wurde die Existenz des heterooligomeren ClpP1P2-Komplexes über die Markierung durch VLP bestätigt (Abbildung 3 der Hintergrundinformationen). Eine äquimolare Mischung von ClpP1 und ClpP2, die unterschiedlich lange inkubiert wurde, zeigte eine gleichstarke Markierung beider Proteine zwischen 24 h und 3 d (Abbildung 4 der Hintergrundinformationen). Dieser Befund belegt, dass ClpP1 durch ClpP2 aktiviert wird. Während koexprimiertes ClpP1P2 mit VLP das gleiche Markierungsprofil ergab, wie es im nativen *Listeria*-Proteom beobachtet wurde, interagierte isoliertes ClpP1 weder mit VLP noch mit einigen ausgewählten monocy-

**Abbildung 2.** A) Fluoreszenz-SDS-PAGE-Analyse des Proteoms aus *L. monocytogenes* nach Inkubation mit VLP und verschiedenen monocyklischen β-Lactonen. B) Kompetitives Experiment mit unterschiedlichem Überschuss an VL. Aktivität von C) rekombinantem ClpP2 und D) einer 1:1-Mischung von ClpP1/ClpP2 nach Inkubation mit VLP, VL und U1P unterschiedlicher Konzentrationen.

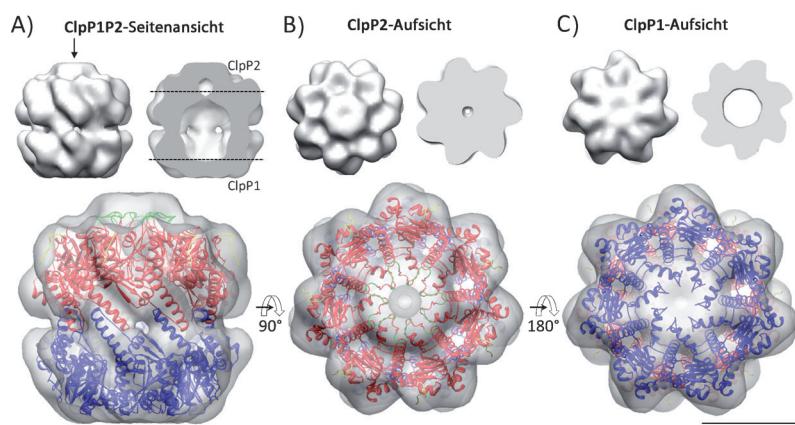
clischen  $\beta$ -Lactonen (U1P, D3). Im Unterschied dazu wurde isoliertes ClpP2 durch alle Lactone markiert (Abbildung 3 der Hintergrundinformationen). Dies deutet stark darauf hin, dass die Gegenwart von ClpP2 entscheidend für die Aktivierung von ClpP1 ist, zumindest in vitro.

In einem Peptidaseaktivitätsassay mit einem fluorogenen Modellsubstrat inhibierten VLP, VL und das monocyclische  $\beta$ -Lacton U1P sowohl ClpP2 mit einem  $EC_{50}$ -Wert von 27, 154 bzw. 4  $\mu\text{M}$  (Abbildung 2C) als auch eine äquimolare ClpP1/ClpP2-Mischung mit einem  $EC_{50}$ -Wert von 41, 167 bzw. 3  $\mu\text{M}$  (Abbildung 2D). Zusätzlich konnte eine kovalente Bindung zwischen VL oder VLP und dem Rest S98 im aktiven Zentrum von ClpP2 über LC-MS nachgewiesen werden (Abbildung 5 der Hintergrundinformationen). Diese Resultate zusammen mit den Befunden aus der Hitzekontrolle (Abbildung 1D der Hintergrundinformationen) demonstrieren, dass die Sondenmarkierung am aktiven Zentrum erfolgt und nur mit dem nativen, gefalteten Protein möglich ist.

Die maximale Peptidaseaktivität wurde bei pH 7 erreicht (Abbildung 6A der Hintergrundinformationen), und die Aktivität von ClpP2 und ClpP1P2 wurde nach der Zugabe von 5% Glycerin mehr als zweifach erhöht (Abbildung 6B der Hintergrundinformationen).<sup>[28]</sup> Für isoliertes ClpP1 wurde unter keinen der hier beschriebenen Bedingungen eine Enzymaktivität beobachtet.

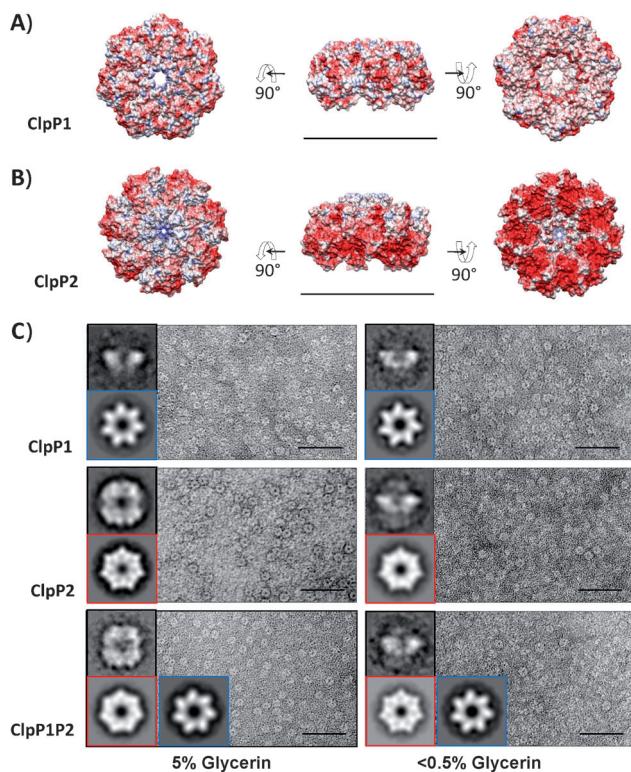
Um die Enzymaktivität mit der strukturellen Organisation von ClpP1, ClpP2 und ClpP1P2 zu vergleichen, wurden alle isolierten Proteine über eine Größenausschlusschromatographie untersucht. Während in Gegenwart von 5 Vol.-% Glycerin ClpP2 und koexprimiertes ClpP1P2 als tetradecamerer Komplex gefunden wurden, dissozierten diese in Abwesenheit von Glycerin zum Großteil in Heptamere (Abbildung 7A der Hintergrundinformationen). Dies lässt darauf schließen, dass Glycerin, welches die kompakte Form von flexiblen Proteinen stabilisiert, die Oligomerisierung zu Tetradecameren unterstützt, wie es früher schon beschrieben wurde.<sup>[29]</sup> ClpP1 kam, unabhängig vom Glyceringehalt, immer als Heptamer vor, was darauf hindeutet, dass die Aktivität von ClpP1/ClpP2 vom oligomeren Aufbau abhängig ist, mit Tetradecameren als aktiver und Heptameren als inaktiver Form. Diese Schlussfolgerung wurde weiterhin durch Inkubation von ClpP2 und koexprimiertem ClpP1P2 mit VLP in Abwesenheit von Glycerin bestätigt, wobei ClpP2 weniger und ClpP1 nicht mehr im koexprimierten Komplex markiert wurden (Abbildung 7B der Hintergrundinformationen).

Um die quartäre Struktur des ClpP1P2-Komplexes im Detail aufzuklären, wurden die Proben über Transmissionselektronenmikroskopie mittels Negativkontrastierung visualisiert (Abbildung 8 der Hintergrundinformationen). So konnten Seitenansichten und Aufsichten von fassförmigen Oligomeren mit einer Höhe von 11.5 nm und einem Durchmesser von 11.0 nm beobachtet werden. Das dreidimensio-



**Abbildung 3:** Dreidimensionales Modell des ClpP1P2-Tetradecamers. Obere Reihe: Oberflächendarstellungen und Dichtequer schnitte des ClpP1P2-Tetradecamers als Seitenansicht (A) und Aufsichten (B,C) mit Querschnitten durch die 7-zählige Symmetriearchse der ClpP1- (B) und ClpP2-Ringe (C). Die Positionen der Schnitte in (B) und (C) sind durch die gestrichelten Linien in (A) gekennzeichnet. Auffällig ist hier die zusätzliche Dichte auf dem ClpP2-Ring (Pfeil). Untere Reihe: Ansichten des Oligomers aus der gleichen Perspektive wie in der oberen Reihe, überlagert mit dem Homologiemodell (Bänderdarstellung) des ClpP1P2-Tetradecamers. Die Bänder von ClpP2 sind in Rot und die von ClpP1 in Blau dargestellt. Die N-terminale Schleife von ClpP2 ist grün, der Strep-Tag ist gelb. Maßstabsbalken: 5 nm.

nale (3D-)Modell (Auflösung 15 Å), das durch Einzelpartikel-Rekonstruktion erhalten wurde, zeigt eine tetradecamere Anordnung mit einer zentralen Pore, ähnlich wie bei ClpP-Strukturen aus anderen Spezies (Abbildung 3).<sup>[26,31]</sup> Hierbei war auffällig, dass die beiden heptameren Ringe des Tetradecamers nicht identisch sind, da einer der Ringe eine zusätzliche Masse an einem Ende des Fasses aufweist (Abbildung 3A). Über Homologiemodellierung des Tetradecamers mit den vorhergesagten Strukturen von ClpP1, ClpP2 und der Struktur von ClpP aus *E. coli* (pdb-Code 1YG6) als Templat, war es möglich, diese zusätzliche Masse einer N-terminalen Schleife zuzuordnen. Diese flexible Schleifenregion mit sechs zusätzlichen Aminosäuren ist nur in der Sequenz von ClpP2 und nicht in der von ClpP1 vorhanden (Abbildungen 2 und 9 der Hintergrundinformationen). Obwohl sich ClpP1- und ClpP2-Monomere bis auf die N-terminalen Schleife (Abbildung 9A der Hintergrundinformationen) in Bezug auf die vorhergesagten sekundären und tertiären Strukturelemente stark ähneln, zeigen die entsprechenden homoheptameren Modelle deutliche Unterschiede (Abbildung 4). Der Porendurchmesser am Eingang von ClpP2 (2 nm) erscheint wegen der Präsenz der N-terminalen Schleife schmäler als in ClpP1 (3 nm; Abbildung 4). Darüber hinaus zeigen die geladenen Reste an der Oberfläche von ClpP1 eine zufällige Verteilung (Abbildung 4A; Abbildung 10 der Hintergrundinformationen), während sich auf der Oberfläche von ClpP2 Bereiche mit hoher negativer Ladung befinden (Abbildung 4B; Abbildung 10 der Hintergrundinformationen). Tatsächlich wurden diese unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften in TEM-Aufnahmen der Homoheptamere von ClpP1 und ClpP2 in der Negativkontrastierung reflektiert. Übereinstimmend mit der Oberflächenladungsverteilung zeigten ClpP2-Heptamere eine starke Akkumulation des Kontrastmittels, welche die leichten Vertiefungen aus der vorhergesagten Struktur



**Abbildung 4.** Verteilung der geladenen Reste auf Homologiemodell-Oberflächen von ClpP1 (A) und ClpP2-Homoheptameren (B). Farbkodierung der Reste: negativ geladen: rot, neutral: weiß, positiv geladen: blau. Maßstabsbalken: 10 nm. C) TEM-Abbildungen von ClpP1, ClpP2 und ClpP1P2-Komplexen (Negativkontrastierung, 0.2 mg mL<sup>-1</sup> Protein, 1.5 Gew.-% Uranylacetat) mit 5 Vol.-% Glyceringehalt (links) oder mit weniger als 0.5 Vol.-% Glycerin (rechts). Einschübe: charakteristische Klassenmittelungen; oben: Seitenansicht; unten: Aufsichten nach siebenfacher Symmetrisierung. Für jeden Datensatz wurden fünf Klassenmittelungen aus etwa 1500 Aufsichten auf die siebenzählige Symmetriearchse berechnet und verglichen. Farbkodierung der Rahmen: ClpP1: blau, ClpP2: rot. Maßstabsbalken: 100 nm. Kastengröße der Klassenmittelungen: 19 nm.

maskierten und weniger konturenreiche Klassenmittelung ergaben (Abbildung 4C). Im Unterschied dazu waren ClpP1-Heptamere nur schwach kontrastiert und ähnelten einem symmetrischen, siebenzackigen Stern. In Übereinstimmung mit der vorhergesagten Struktur erschien auch die zentrale Pore von ClpP2 in der Kontrastierung schmäler als bei ClpP1. Gemäß den Befunden der Größenausschlusschromatographie (Abbildung 7A der Hintergrundinformationen) wurden in der Probe des koexprimierten ClpP1P2-Komplexes, die 5% Glycerin enthielt, hauptsächlich tetradecamere Oligomere beobachtet, deren Aufsichten stark denen von ClpP1- und ClpP2-homoheptameren Ringen ähnelten (Abbildung 4C). Bei einer Glycerinkonzentration unter 0.5% wurden wiederum nur Klassenmittelungen in Analogie zu den ClpP1- oder ClpP2-Homoheptameren gefunden. Da diese homoheptameren Ringe aus der Dissoziation der tetradecameren Spezies stammen, kann zusammengefasst werden, dass das ClpP1P2-Tetradecamer hauptsächlich aus homoheptameren ClpP1- und ClpP2-Ringen zusammengesetzt ist.

Eine andere Strukturanzordnung wurde für entfernt verwandte, in Cyanobakterien vorkommende ClpP-Isoformen vorgeschlagen, die aus zwei heteroheptameren Ringen zusammengesetzt sein sollen.<sup>[27,30]</sup> Übereinstimmend mit den hier vorgestellten Ergebnissen deutet dies auf eine funktionelle Spezialisierung von ClpP-Isoformen, mit bis heute unerforschten, vermutlich regulatorischen Funktionen, hin.

Zusammenfassend berichten wir hier über das bicyclische  $\beta$ -Lacton Vibralacton als neue Sonde für die Markierung zweier Isoformen der bedeutenden ClpP-Protease aus *L. monocytogenes*. Wir haben die Anwendung der Sonde als Hilfsmittel erweitert, um die Aktivität und die Anordnung der ClpP1- und ClpP2-Untereinheiten in einem heterooligomeren Komplex zu untersuchen. Unsere Befunde lassen darauf schließen, dass ClpP1 durch eine Heterooligomerisation mit ClpP2 aktiviert wird. TEM-Aufnahmen geben Aufschluss darüber, dass der tetradecamere Komplex aus zwei aufeinanderliegenden homoheptameren ClpP1- und ClpP2-Ringen zusammengesetzt ist. Diese Beobachtungen geben den ersten Einblick in eine neue Komplexanordnung einer für Bakterien wichtigen Enzymklasse.

Eingegangen am 24. Juni 2011,  
veränderte Fassung am 1. August 2011  
Online veröffentlicht am 22. September 2011

**Stichwörter:** Elektronenmikroskopie · Naturstoffe · Proteinstrukturen · Proteomik · Vibralacton

- [1] D. S. Johnson, E. Weerapana, B. F. Cravatt, *Future Med. Chem.* **2010**, 2, 949.
- [2] T. Böttcher, S. A. Sieber, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 4677; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 4600.
- [3] T. Böttcher, S. A. Sieber, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 14400.
- [4] C. Drahla, B. F. Cravatt, E. J. Sorensen, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 5936; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 5788.
- [5] T. Böttcher, S. A. Sieber, *ChemMedChem* **2009**, 4, 1260.
- [6] Z. Wang, C. Gu, T. Colby, T. Shindo, R. Balamurugan, H. Waldmann, M. Kaiser, R. A. van der Hoorn, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, 4, 557.
- [7] M. H. Ngai, P. Y. Yang, K. Liu, Y. Shen, M. R. Wenk, S. Q. Yao, M. J. Lear, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 8335.
- [8] P. Y. Yang, K. Liu, M. H. Ngai, M. J. Lear, M. R. Wenk, S. Q. Yao, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 656.
- [9] D. Frees, K. Sorensen, H. Ingmer, *Infect. Immun.* **2005**, 73, 8100.
- [10] A. Michel, F. Agerer, C. R. Hauck, M. Herrmann, J. Ullrich, J. Hacker, K. Ohlsen, *J. Bacteriol.* **2006**, 188, 5783.
- [11] D. Frees, K. Savijoki, P. Varmanen, H. Ingmer, *Mol. Microbiol.* **2007**, 63, 1285.
- [12] D. Z. Liu, F. Wang, T. G. Liao, J. G. Tang, W. Steglich, H. J. Zhu, J. K. Liu, *Org. Lett.* **2006**, 8, 5749.
- [13] E. J. Corey, W. D. Li, *Chem. Pharm. Bull.* **1999**, 47, 1.
- [14] R. H. Feling, G. O. Buchanan, T. J. Mincer, C. A. Kauffman, P. R. Jensen, W. Fenical, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 369; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 355.
- [15] T. Böttcher, M. Pitscheider, S. A. Sieber, *Angew. Chem.* **2010**, 122, 2740; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 2680.
- [16] M. Fonović, M. Bogyo, *Expert Rev. Proteomics* **2008**, 5, 721.
- [17] M. J. Evans, B. F. Cravatt, *Chem. Rev.* **2006**, 106, 3279.
- [18] Q. Zhou, B. B. Snider, *Org. Lett.* **2008**, 10, 1401.
- [19] A. E. Speers, G. C. Adam, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 4686.

- [20] R. Huisgen, *1,3 Dipolar Cycloaddition Chemistry*, Wiley, New York, **1984**.
- [21] V. V. Rostovtsev, J. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2708; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596.
- [22] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057.
- [23] A. Szyk, M. R. Maurizi, *J. Struct. Biol.* **2006**, *156*, 165.
- [24] A. Y. Yu, W. A. Houry, *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 3749.
- [25] A. Gribun, M. S. Kimber, R. Ching, R. Sprangers, K. M. Fiebig, W. A. Houry, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 16185.
- [26] S. R. Geiger, T. Böttcher, S. A. Sieber, P. Cramer, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 5867; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 5749.
- [27] T. M. Stanne, E. Pojidaeva, F. I. Andersson, A. K. Clarke, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 14394.
- [28] M. W. Thompson, M. R. Maurizi, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 18201.
- [29] Z. Maglica, K. Kolygo, E. Weber-Ban, *Structure* **2009**, *17*, 508.
- [30] F. I. Andersson, A. Tryggvesson, M. Sharon, A. V. Diemand, M. Classen, C. Best, R. Schmidt, J. Schelin, T. M. Stanne, B. Bukau, C. V. Robinson, S. Witt, A. Mogk, A. K. Clarke, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 13519.
- [31] Die EM-3D-Struktur des tetradecameren ClpP1P2-Komplexes wurde in der EMBD-Datenbank mit dem Zugangscode EMD-1913 hinterlegt.