

# Struktur und Mechanismus des Heterokomplexes der caseinolytischen Protease ClpP1/2 aus *Listeria monocytogenes*\*\*

Maria Dahmen, Marie-Theres Vielberg, Michael Groll\* und Stephan A. Sieber\*

**Abstract:** Eine Infektion mit dem Human-Pathogen *Listeria monocytogenes* kann zu schwerwiegenden Infektionen mit teilweise tödlichem Ausgang führen. Die Virulenz und intrazelluläre Stresstoleranz des Bakteriums wird von der caseinolytischen Protease P (ClpP), einem Enzym, das in Bakterien hoch konserviert ist, reguliert. *L. monocytogenes* bildet zwei ClpP-Isoformen, die auf sequentieller Ebene nur entfernt miteinander verwandt sind und sich in Katalyse, Oligomerisierungszustand, Zusammensetzung ihrer aktiven Zentren und den am N-Terminus lokalisierten Bindungsstellen für die interagierenden AAA<sup>+</sup>-Chaperone unterscheiden. In dieser Arbeit haben wir die Kristallstruktur des ClpP1/2-Heterokomplexes aus *L. monocytogenes* gelöst und gewähren in Verbindung mit biochemischen Studien Einblicke in dessen Wirkmechanismus. Die Ergebnisse zeigen, dass die strukturelle Verzahnung von LmClpP1 und LmClpP2 die Bildung eines Heterotetradekamers, Ausrichtung aller 14 aktiven Zentren und eine Steigerung der proteolytischen Aktivität bewirkt. Die katalytischen Zentren wurden zudem als für die transiente Stabilität des Komplexes verantwortlich identifiziert.

In Prokaryoten wird der Proteinabbau von einer Vielzahl von ATP-abhängigen Proteasen vermittelt. Ein Vertreter dieser Klasse mit essentiellen regulatorischen Aufgaben für z.B. DNA-Reparatur, Zellhomöostase und Virulenz ist die caseinolytische Protease P (ClpP).<sup>[1]</sup> ClpP besitzt eine fassartige, 14-gliedrige Struktur, die aus zwei heptameren Ringen aufgebaut ist.<sup>[2]</sup> Obwohl ClpP allein in der Lage ist, kleine Peptide zu spalten, begrenzen die axialen Poren den Abbau

größerer Proteinketten.<sup>[3]</sup> Für eine kontrollierte Proteolyse binden sogenannte AAA<sup>+</sup>-Chaperone (z.B. ClpX, ClpA und ClpC) an die apikalen Seiten des Zylinders, um dort die Erkennung, Entfaltung und ATP-abhängige Einschleusung größerer Proteinsubstrate in die proteolytische Kammer zu katalysieren.<sup>[4]</sup> ClpXP ist für die Zelle von essentieller Bedeutung, um beschädigte und SsrA-markierte Proteine, die unter zellulären Stressbedingungen am Ribosom verbleiben, zu entfernen.<sup>[5]</sup> Es wurde mehrfach berichtet, dass ClpXP eine zusätzliche Rolle in der Virulenzregulation pathogener Bakterien wie z.B. *L. monocytogenes* einnimmt.<sup>[1c,6]</sup> Im Gegensatz zu der Vielzahl bakterieller Organismen kodieren *L. monocytogenes* und *Mycobacterium tuberculosis* zwei ClpP-Isoformen.<sup>[7]</sup> Über die Rolle dieser ist jedoch wenig bekannt, und es werden kleinere Unterschiede zwischen den Spezies beschrieben. Während LmClpP2 als essentiell für die Virulenz des Lebensmittelpathogens *L. monocytogenes*, das sich innerhalb der Zellen seines Wirts vermehrt,<sup>[8]</sup> beschrieben wurde, ist die Funktion von LmClpP1 unbekannt.<sup>[6]</sup> LmClpP2 bildet ein aktives, tetradekameres Enzym, dass eine Sequenzidentität von 66 % mit ClpP aus *Escherichia coli* teilt.<sup>[7a,9]</sup> Obwohl die Identität zwischen den LmClpP-Isoformen 42 % beträgt, ist LmClpP1 am N-Terminus verkürzt und besitzt ein verändertes katalytisches Zentrum, in dem Aspartat gegen ein Asparagin ausgetauscht wurde (Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen). Es wird als inaktives Heptamer gebildet, welches nur im tetradekameren Komplex mit LmClpP2 peptidolytische Aktivität erlangt.<sup>[9]</sup> Kürzlich konnten die Kristallstrukturen von LmClpP1 (PDB: 4JCQ) und LmClpP2 (PDB: 4JCT) in inaktiver Konformation mit fehl ausgerichteten katalytischen Zentren (S98, His123, Asp/Asn172; Nummerierung entsprechend Abbildung S1<sup>[9]</sup>) gelöst werden, was Fragen bezüglich der funktionalen Interaktion beider Enzyme aufwirft. Diese werden von uns mithilfe der strukturellen und biochemischen Daten des aktiven LmClpP1/2-Heterokomplexes mit 14 korrekt orientierten katalytischen Zentren, erhöhter proteolytischer Aktivität und einer unidirektionale Interaktion mit dem dazugehörigen LmClpX-Chaperon beantwortet.

Eine große Einschränkung in bekannten Reinigungsverfahren des LmClpP1/2-Heterokomplexes war das variierende Verhältnis beider Isoformen zueinander.<sup>[7a,9]</sup> Daher verwendeten wir eine neue Expressionsstrategie, bei der LmClpP1 mit einem C-terminalen Strep-Tag und LmClpP2 mit einem C-terminalen His-Tag versehen wurde (Abbildung S2). Aufeinanderfolgende Ni- und Strep-Affinitätschromatographie des koexprimierten Lysats führten nach Größenausschlusschromatographie zur Isolierung des Komplexes in einem 1:1-Verhältnis, was durch massenspektrometrische Analyse bestätigt wurde (Abbildung S3). Interessanterweise erhöhte die

[\*] M. Dahmen,<sup>[†]</sup> M.-T. Vielberg,<sup>[†]</sup> Prof. Dr. M. Groll, Prof. Dr. S. A. Sieber  
Center for Integrated Protein Science Munich CIPS<sup>®</sup>Department of Chemistry, Technische Universität München  
Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching (Deutschland)  
E-Mail: michael.groll@tum.de  
stephan.sieber@tum.de

[†] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

[\*\*] Wir danken Mona Wolff und Katja Bäuml für exzellente wissenschaftliche Unterstützung, Evelyn Zeiler und Malte Gersch für wissenschaftliche Diskussionen, der Belegschaft der Beamline X06SA des Paul Scherrer Instituts, Swiss Light Source (Villigen, Schweiz) für Hilfe bei der Datenerfassung und Marcin Drag und Marcin Poreba für die Bereitstellung des Tripeptidsubstrats. Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, SFB749, SFB1035, FOR1406 und dem ERC starting grant (250924-antibacterials) finanziell unterstützt.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (experimentelle Details zur Genexpression und Proteinaufreinigung, zu verwendeten Bioassays sowie zur Kristallisation und Strukturanalyse) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201409325> zu finden.

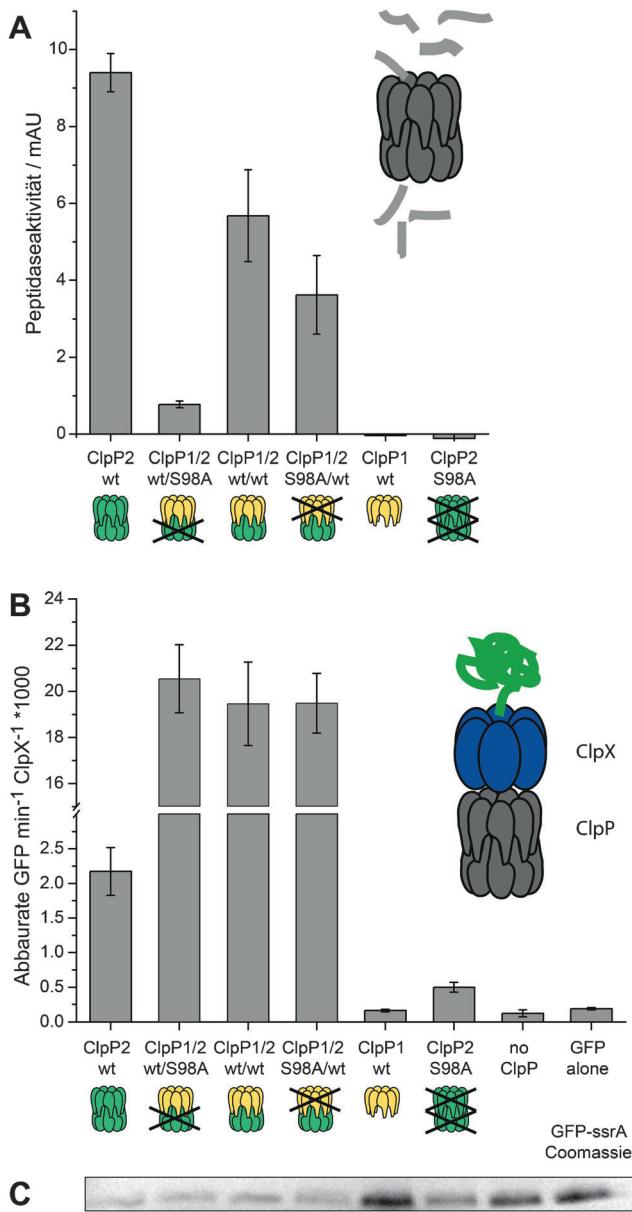
einmalige Zugabe von 1% CHAPS zum Lysepuffer die Ausbeute um das 150fache (Abbildungen S4 und S5).

Die Peptidaseaktivität von LmClpP1/2 wurde mit dem bereits etablierten fluoreszierenden Tripeptidsubstrat (Leu-ACC)<sup>[9]</sup> getestet und zeigte im Vergleich zum LmClpP2-Homokomplex eine um 40% reduzierte Hydrolyserate (Abbildung 1A). Um die individuelle Enzymaktivität innerhalb des Heterokomplexes zu untersuchen, wurde der Serinrest im aktiven Zentrum von LmClpP1 oder LmClpP2 zu Alanin

(S98A) mutiert. Obwohl LmClpP1/2(S98A) im Vergleich zu heptamerem ClpP1 eine erhöhte Peptidaseaktivität besitzt, war die Rate im Vergleich zum LmClpP2-Homokomplex ungefähr zehnfach und im Vergleich zu LmClpP1(S98A)/2 fünfach reduziert (Abbildung 1A). Diese Ergebnisse zeigen, dass LmClpP1 zwar innerhalb des Heterokomplexes signifikant aktiviert ist, seine peptidolytische Aktivität jedoch hinter der von LmClpP2 zurückbleibt. Wie erwartet, war der für LmClpP1(S98A)/2 gemessene Wert halb so groß wie der für LmClpP2, was darauf hindeutet, dass für maximale Aktivität alle katalytischen Zentren korrekt orientiert sein müssen.

Als nächstes untersuchten wir die proteolytischen Eigenschaften des Heterokomplexes in Verbindung mit dem AAA<sup>+</sup>-Chaperon LmClpX, das in seiner aktiven Form kloniert, überexprimiert und gereinigt wurde (Abbildung S6). Zur Durchführung des Assays wurde außerdem das für solche Zwecke verwendete GFP-SsrA-Fusionsprotein hergestellt.<sup>[10]</sup> Da ATP-abhängige Chaperone im Komplex mit ClpP dieses erkennen und entfalten ohne es dabei zu verdauen,<sup>[10]</sup> wurde zunächst die Hintergrundrate in Anwesenheit von LmClpX und katalytisch inaktivem LmClpP2(S98A) bestimmt (Abbildung 1B,C). Der Verdau von GFP-SsrA durch den aktiven LmClpXP-Komplex lässt sich durch die Abnahme der Fluoreszenzintensität über die Zeit sowie durch eine verschwindende Bande in der SDS-PAGE (Abbildung 1C) zeigen. Überraschenderweise wurde eine bis zu neunfache Erhöhung der proteolytischen Aktivität bei Inkubation von sowohl LmClpP1/2 als auch LmClpP1(S98A)/2 sowie LmClpP1/2-(S98A) im Vergleich zu LmClpP2, jeweils im Komplex mit LmClpX, beobachtet. Die Steigerung der Reaktionsrate resultierte nicht aus einer erhöhten LmClpX-Aktivität, da weder die Zugabe von LmClpP2 noch des Heterokomplexes Einfluss auf die Geschwindigkeit der ATP-Hydrolyse hatte (Abbildung S6). Daraus lässt sich schließen, dass die peptidolytische Funktion von LmClpP1 zwar beeinträchtigt ist, es aber dennoch über ausreichend Aktivität verfügt, um die von LmClpP2 in der Proteolyse zu kompensieren. Interessanterweise besitzt der mykobakterielle ClpP1/2-Komplex in Verbindung mit dem Chaperon MtClpC1 ebenfalls eine erhöhte Abbaurate, wenn einer der beiden ClpP-Ringe inaktiviert wurde. Dies stützt unseren Befund und verdeutlicht, dass die peptidolytischen und proteolytischen Aktivitäten zumindest in Heterokomplexen entkoppelt sind.<sup>[11]</sup>

Eine auffallende Eigenschaft von LmClpP1 im Gegensatz zu LmClpP2 ist die geringe Sequenzidentität mit anderen ClpPs, besonders im Hinblick auf den N-Terminus der Untereinheiten. Massive Abweichungen in konservierten Interaktionssequenzen legen nahe, dass eine Assoziation mit AAA<sup>+</sup>-Chaperonen unmöglich ist.<sup>[12]</sup> Dies lässt vermuten, dass LmClpX ausschließlich über LmClpP2 an den Heterokomplex binden kann. Um diese Hypothese zu untersuchen, nutzten wir eine zuvor etablierte, konstitutiv aktive LmClpP1(N172D)-Mutante, die ein Tetradekamer bildet und messbare Peptidaseaktivität aufweist (Abbildung S7).<sup>[9]</sup> Nach Zugabe von LmClpX konnte jedoch kein Abbau von GFP-SsrA beobachtet werden, was bedeutet, dass der peptidolytisch aktive Komplex das Chaperon nicht binden kann (Abbildung S8). Obwohl im Moment keine hochauflösten

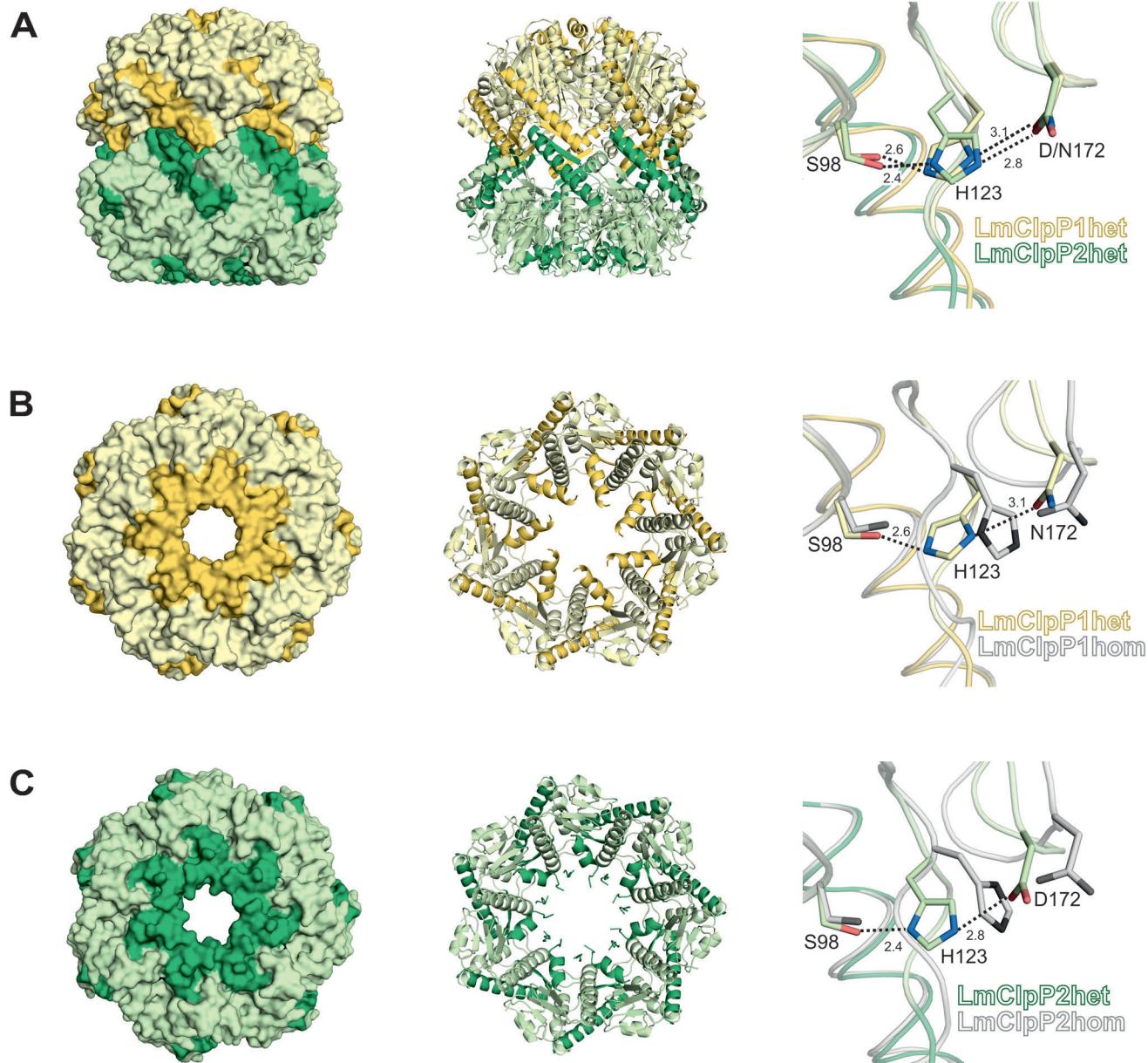


**Abbildung 1.** Heterokomplex-Aktivität. A) Peptidaseaktivität der LmClpP-Proteine (1  $\mu$ M) gemessen mit 100  $\mu$ M Leu-ACC bei 37°C. B) Proteaseaktivität der LmClpP-Proteine (0.2  $\mu$ M LmClpP<sub>14</sub>) in Anwesenheit von 0.4  $\mu$ M LmClpX<sub>6</sub> und 0.4  $\mu$ M GFP-SsrA in Regenerationspuffer. Beide Datensätze stellen drei unabhängige Experimente dar (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung). C) Entsprechendes Coomassie-gefärbtes Gel des GFP-SsrA-Verdaus nach 3 h.

strukturellen Daten eines ClpXP-Komplexes zur Verfügung stehen, deuten die Ergebnisse auf eine einseitige Bindung von LmClpX an die LmClpP2-Pore hin.

Um die molekularen Interaktionen, die für die Heterokomplexaktivität verantwortlich sind, zu studieren, kristallisierten wir LmClp1/2 und lösten die Struktur durch molekularen Ersatz bei einer Auflösung von 2.8 Å ( $R_{\text{frei}} = 21.7\%$ , Tabelle S2, PDB: 4RYF). Der Heterokomplex besteht aus je einem heptameren Homo-LmClpP1- und Homo-LmClpP2-Ring, die durch gegenseitige Bindung die ClpP-typische, tetradekamere Struktur bilden (Abbildung 2, Abbildung S9). Der Gesamtkomplex hat eine Höhe von 100 Å und einen

Durchmesser von 95 Å. Beide Untereinheiten weisen eine hohe strukturelle Identität auf, obwohl ihnen nur 42% ihrer Sequenz gemeinsam ist. Die Überlagerung von LmClpP1 mit LmClpP2 und Analyse der Kontaktflächen zwischen den Monomeren zeigt eine sterische Beeinträchtigung der einzelnen angrenzenden Untereinheiten, weshalb die Bildung gemischter Heptamere ausgeschlossen werden kann (Abbildung S10). Die beiden Ringe von LmClpP1/2 sind durch ihre benachbarten, in ausgestreckter Konformation vorliegenden E-Helices nahtlos ineinander verzahnt. Dieses wichtige Sekundärstrukturrelement ist im Wesentlichen für die Bildung des Tetradekamers verantwortlich.<sup>[13]</sup> Daran schließt sich in



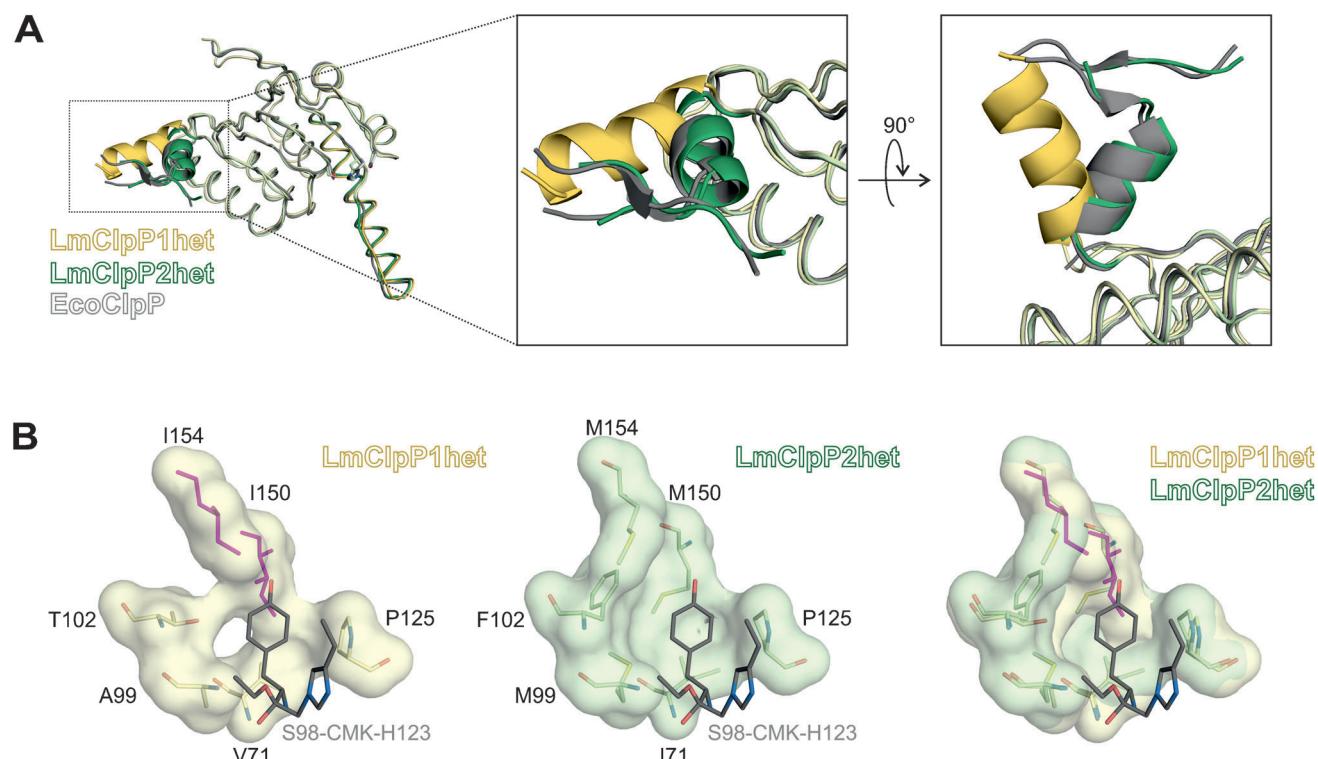
**Abbildung 2.** Kristallstruktur des LmClpP1/2-Heterokomplexes (PDB: 4RYF). A) Seitenansicht des Komplexes mit LmClpP1 (gold) und LmClpP2 (grün). Überlagerung der ausgerichteten katalytischen Zentren. B) Aufsicht der LmClpP1-Seite des Heterokomplexes. Überlagerung der katalytischen Reste Ser98, His123 und Asn172 des Homo- und Heterokomplexes von LmClpP1. C) Aufsicht der LmClpP2-Seite des Heterokomplexes. Überlagerung der katalytischen Reste Ser98, His123 und Asp172 des Homo- und Heterokomplexes von LmClpP2. Bereits bekannte Strukturen sind grau, die Heteroatome N und O blau bzw. rot dargestellt.

beiden Ringen ein  $\beta$ -Faltblatt an (Reste 126–131), das über Wasserstoffbrücken zur Stabilisierung zwischen den Hälften beiträgt (Abbildung S9B). Zusätzlich ist entlang der Heptamer-Schnittstelle der konservierte Asp170-Arg171-Sensor ausgerichtet, der durch seine direkte Verbindung mit dem katalytischen Zentrum ein weiteres Kennzeichen von ClpPs in aktiver Konformation darstellt (Abbildung S9D).<sup>[13–14]</sup> Große strukturelle Unterschiede zwischen LmClpP1 und LmClpP2 werden an den apikalen Seiten des Heterokomplexes sichtbar. Während LmClpP2 hier mit seiner flach gestalteten Oberfläche eine gute Andockstelle für LmClpX bietet, weist LmClpP1 eine ungewöhnlich runde Form auf (Abbildung 2 A). Diese wird durch die N-terminalen Reste 17–28 (Abbildung S1), die eine lange Helix ausbilden und so die axiale Pore formen, hervorgerufen (Abbildung 2 und Abbildung 3 A).

Im Gegensatz zu der zuvor veröffentlichten Struktur nimmt die katalytische Triade in LmClpP2 des Heterokomplexes eine Anordnung an, in der das Enzym aktiv ist (Abbildung 2 C). Während isoliertes LmClpP1 in einer komprimierten Konformation mit einem verdrehten und inaktiven katalytischen Zentrum vorliegt, kommt es innerhalb des Heterokomplexes zur Bildung einer katalytischen Ser98-His123-Dyade, die darüber hinaus durch Polarisation des Asn172-Rests stabilisiert wird (Abbildung 2 A und B). Zusätzlich zu dieser Umwandlung vom inaktiven zum aktiven Zustand unterlaufen His123 und Asn172 große konformelle Rotationen, welche nicht nur die Aktivierung von Ser98 be-

wirken, sondern auch die E-Helix verlängern und den Asp170-Arg171-Sensor ausrichten (Abbildung S9A und D). Obwohl das Carbonyl-Sauerstoffatom von Asn172, im Vergleich zu Asp172 von LmClpP2, bemerkenswerterweise nur über eine schwache H-Bindung mit His123 wechselwirken kann, ist seine Anwesenheit für die Acylierungsaktivität entscheidend. Dies wurde bereits mit einer inaktiven Asn172Ala-Mutation gezeigt.<sup>[7a]</sup> Weiterhin deutet die beobachtete Rotation des Asn172 und die damit verbundene Interaktion mit His123 auf einen konservierten Mechanismus hin, der die Bewegung aller drei katalytischen Reste umfasst. Überraschenderweise wies die LmClpP1/2-Struktur im Vergleich zu LmClpP2 keine zusätzliche Stabilisierung des Heterokomplexes auf, sondern nur eine strikte Konservierung der Schlüsselinteraktionsstellen (Abbildung S9). Eine niedrigere Schmelztemperatur von LmClpP1/2 im Vergleich mit LmClpP2, welche im Thermal-Shift-Assay bestimmt wurde, verdeutlicht, dass LmClpP1/2 einen transienten Heterokomplex bildet, der mit LmClpP2-Tetradekameren und LmClpP1-Heptameren koexistiert (Abbildung S11).

Eine strukturelle Überlagerung von *E. coli* ClpP, das im aktiven Zentrum einen Z-LY-Chloromethylketon-Inhibitor gebunden hat (CMK, PDB: 2FZS),<sup>[15]</sup> und dem LmClpP1/2 apo-Heterokomplex ermöglichte die Zuordnung der entsprechenden S1-Substratstellen (Abbildung 3 B). Während LmClpP2 und EcClpP aufgrund konservierter Reste dieselbe Organisation und Größe der Tasche aufweisen, ist der verfügbare Platz in LmClpP1 durch Ile150 und Ile154 begrenzt



**Abbildung 3.** A) Überlagerung von LmClpP1 und LmClpP2 des Heterokomplexes mit EcClpP. B) S1-Tasche des heterooligomeren LmClpP1 und LmClpP2 mit einer Überlagerung des Z-LY-CMK-Inhibitors aus dem aktiven Zentrum von EcClpP (grau dargestellt). Die Reste 150 und 154 von LmClpP1, die für die Größenreduzierung der S1-Tasche und die sterische Kollision mit dem Tyr-Rest verantwortlich sind, sind pink dargestellt. Die übrigen Farben sind übereinstimmend mit Abbildung 2 gewählt.

(Abbildung 3B, Abbildung S12). Diese Modifikation führt zu einer kleineren und definierteren Spezifitätstasche, was den Zugang von größeren Resten wie z. B. P1-Tyr einschränkt. Dies passt zu der bereits beobachteten P1-Leu-Präferenz von LmClpP1 für die Peptidsubstratspaltung.<sup>[9]</sup> Zudem binden β-Lacton-Inhibitoren mit längeren Seitenketten nur an LmClpP2, während diejenigen mit kürzeren Seitenketten auch LmClpP1 markieren.<sup>[9]</sup> Diese Ergebnisse lassen eine Spezialisierung von LmClpP1 und LmClpP2 auf unterschiedliche Substrate vermuten und ermöglichen das Design maßgeschneiderter Inhibitoren, welche selektiv eines der beiden Enzyme adressieren.

Zusammenfassend gewähren wir anhand der Kristallstruktur des ClpP1/2-Heterokomplexes aus *L. monocytogenes* einzigartige Einblicke in den Aktivierungsmechanismus dieses Enzyms. Unsere Beobachtungen lassen auf eine unidirektionale Interaktion von LmClpP2 mit ClpX im Heterokomplex schließen, die eine erhöhte Proteolyserate zur Folge hat. Die Bildung des Heterokomplexes durch LmClpP2 und LmClpP1 führt zur Faltung der intrinsisch ungeordneten E-Helix in den 14 Untereinheiten und zur aktiven Anordnung aller katalytischen Zentren (Abbildung 2, Abbildung S13). Die trotz großer Abweichungen in der Primärsequenz hohe strukturelle Konservierung wird durch die sowohl im Homo- als auch im Heterokomplex identischen Schlüsselinteraktionen unterstrichen. Des Weiteren weist die LmClpP1/2-Struktur auf einen generellen ClpP-Aktivierungsmechanismus hin, bei dem die katalytischen Reste Asn/Asp172 eine entscheidende Rolle für die Komplexstabilität, den Oligomerisierungszustand und die Aktivität des Enzyms spielen. In früheren ClpP-Strukturen, die auf Kristallen beruhten, welche bei niedrigerem pH-Wert entstanden sind, wurde die Protonierung des katalytischen Aspartats beobachtet, was einer Nachahmung von Asn172 entspricht. Bemerkenswerterweise gibt es in diesen Strukturen eine Übereinstimmung dahingehend, dass es zum Kollaps der Triade kommt, was wiederum zur Bildung des daraus resultierenden komprimierten Zustands führt.<sup>[16]</sup> Ebenso wurde die Dissoziation von ClpP in Heptamere bereits nach Zugabe von Inhibitoren des aktiven Zentrums beobachtet.<sup>[17]</sup> Die Disproportionierung der ClpP-Tetradekamere und die Bildung transienter Komplexe scheint ein Merkmal von Proteasen dieser Klasse zu sein.

Während die exakte biologische Rolle von LmClpP1/2 schwer zu ermitteln ist, stellten wir in Verbindung mit ClpX eine erhöhte katalytische Aktivität fest, welche dem schnellen Abbau falsch oder nicht gefalteter Proteine unter Stressbedingungen wie z. B. der Wirtszelleninvasion dienen könnte. Dies steht in Einklang mit Echtzeit-PCR-Experimenten, die eine siebenfache Erhöhung der Transkription der LmClpP1- und LmClpP2-Gene unter Hitzestress zeigen (Abbildung S14). Ferner konnten bereits durch Experimente mit verschiedenen Liganden spezialisierte Substratspezifitäten beider Enzyme bestimmt werden,<sup>[9]</sup> die sich in den beschriebenen Unterschieden der Bindetaschen widerspiegeln. Vor allem die S1-Tasche von LmClpP1 ist durch ihre sterisch eingeschränkte Architektur für die Erkennung kleinerer Reste prädestiniert. Die dadurch erhöhte Affinität zum Substrat verlängert die Dauer der Bindung und kompensiert

die reduzierte katalytische Aktivität des Ser-His-Asn-Zentrums. Zukünftige Arbeiten werden sich auf das Design spezifischer LmClpP1- und LmClpP2-Inhibitoren für die Behandlung von Infektionen durch *L. monocytogenes* fokussieren, welche auf Grundlage dieser Arbeit durch Struktur-Wirkungs-Beziehungen adressiert werden können.

Bemerkung: Während der Begutachtung dieses Beitrags veröffentlichten Sauer et al. die Kristallstruktur des *M. tuberculosis*-Heterokomplexes im Verbund mit zwei Liganden, einem Acyldepsipeptid (AEDP) sowie einem Agonistpeptid.<sup>[18]</sup> Im Gegensatz zu LmClpP1/2 benötigt MtClpP1/2 die Hilfe dieser Aktivatoren, die synergistisch die Proteolyse stimulieren. Demnach verschaffen die Strukturen beider Enzymkomplexe komplementäre mechanistische Einblicke.

Eingegangen am 21. September 2014,  
veränderte Fassung am 10. November 2014  
Online veröffentlicht am 29. Januar 2015

**Stichwörter:** ClpP · Enzymkatalyse · Heterokomplexe · Proteinstrukturen · Proteolyse

- [1] a) T. A. Baker, R. T. Sauer, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2012**, *1823*, 15–28; b) Y. Katayama-Fujimura, S. Gottesman, M. R. Maurizi, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 4477–4485; c) D. Frees, S. N. Qazi, P. J. Hill, H. Ingmer, *Mol. Microbiol.* **2003**, *48*, 1565–1578.
- [2] a) M. R. Maurizi, W. P. Clark, Y. Katayama, S. Rudikoff, J. Pumphrey, B. Bowers, S. Gottesman, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 12536–12545; b) J. Wang, J. A. Hartling, J. M. Flanagan, *Cell* **1997**, *91*, 447–456.
- [3] a) M. C. Bewley, V. Graziano, K. Griffin, J. M. Flanagan, *J. Struct. Biol.* **2009**, *165*, 118–125; b) A. Gribun, M. S. Kimber, R. Ching, R. Sprangers, K. M. Fiebig, W. A. Houry, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 16185–16196.
- [4] a) M. W. Thompson, M. R. Maurizi, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 18201–18208; b) A. Battesti, S. Gottesman, *Curr. Opin. Microbiol.* **2013**, *16*, 140–147; c) E. U. Weber-Ban, B. G. Reid, A. D. Miranker, A. L. Horwich, *Nature* **1999**, *401*, 90–93.
- [5] S. Gottesman, E. Roche, Y. Zhou, R. T. Sauer, *Genes Dev.* **1998**, *12*, 1338–1347.
- [6] O. Gaillot, E. Pellegrini, S. Bregenholt, S. Nair, P. Berche, *Mol. Microbiol.* **2000**, *35*, 1286–1294.
- [7] a) E. Zeiler, N. Braun, T. Bottcher, A. Kastenmuller, S. Weintraub, S. A. Sieber, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 11001–11004; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 11193–11197; b) T. Akopian, O. Kandror, R. M. Raju, M. Unnikrishnan, E. J. Rubin, A. L. Goldberg, *EMBO J.* **2012**, *31*, 1529–1541; c) R. M. Raju, M. Unnikrishnan, D. H. Rubin, V. Krishnamoorthy, O. Kandror, T. N. Akopian, A. L. Goldberg, E. J. Rubin, *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, e1002511.
- [8] J. A. Vazquez-Boland, M. Kuhn, P. Berche, T. Chakraborty, G. Dominguez-Bernal, W. Goebel, B. Gonzalez-Zorn, J. Wehland, J. Kreft, *Clin. Microbiol. Rev.* **2001**, *14*, 584–640.
- [9] E. Zeiler, A. List, F. Alte, M. Gersch, R. Wachtel, M. Poreba, M. Drag, M. Groll, S. A. Sieber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 11302–11307.
- [10] Y. I. Kim, R. E. Burton, B. M. Burton, R. T. Sauer, T. A. Baker, *Mol. Cell* **2000**, *5*, 639–648.
- [11] K. R. Schmitz, R. T. Sauer, *Mol. Microbiol.* **2014**, *93*, 617–628.
- [12] M. C. Bewley, V. Graziano, K. Griffin, J. M. Flanagan, *J. Struct. Biol.* **2006**, *153*, 113–128.

- [13] M. Gersch, A. List, M. Groll, S. A. Sieber, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 9484–9494.
- [14] K. Liu, A. Ologbenla, W. A. Houry, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2014**, *1*–13.
- [15] A. Szyk, M. R. Maurizi, *J. Struct. Biol.* **2006**, *156*, 165–174.
- [16] a) S. R. Geiger, T. Bottcher, S. A. Sieber, P. Cramer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 5749–5752; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 5867–5871; b) J. Zhang, F. Ye, L. Lan, H. Jiang, C. Luo, C. G. Yang, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 37590–37601.
- [17] M. Gersch, R. Kolb, F. Alte, M. Groll, S. A. Sieber, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 1360–1366.
- [18] K. R. Schmitz, D. W. Carney, J. K. Sello, R. T. Sauer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, E4587–4595.