

Supporting Information

© Wiley-VCH 2011

69451 Weinheim, Germany

A Conformational Switch Underlies ClpP Protease Function**

Sebastian R. Geiger, Thomas Böttcher, Stephan A. Sieber, and Patrick Cramer**

anie_201100666_sm_miscellaneous_information.pdf

anie_201100666_sm_geigersupplementalmovie.mov

Supporting Information

Protein preparation. The gene for *S. aureus* NCTC 8325 ClpP (Protein ID: YP_499347) was cloned into vector pDest007, resulting in a C-terminal streptavidin tag on ClpP^[1]. ClpP was expressed for 2 h at 37 °C in *E. coli* BL21 (DE3) RIL cells (Agilent). Cells were harvested by centrifugation, resuspended in 50 ml buffer A (50 mM Tris pH 7.5, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, 10% (v/v) glycerol) and lysed by French Press. After centrifugation, 0.1% polyethylenimine (PEI) pH 8.0 was added and proteins were separated by centrifugation. The supernatant was adjusted to 100 mM KCl and the protein was loaded on a HiTrap Q HP column (GE Healthcare), equilibrated with buffer A including 100 mM KCl. The protein was eluted in a linear gradient from 0.1 M KCl to 0.4 M KCl in 26 column volumes (130 mL, 2 mL/min). ClpP was collected in HiTrapTMQ HP fractions eluting from 0.22 M to 0.28 M KCl. Pooled peak fractions were purified on StrepTactin[®] Superflow[®] beads (IBA). The protein was concentrated to 5.5 mg/mL in buffer B (50 mM Tris pH 7.5, 200 mM NaCl, 5 mM DTT) for crystallization experiments.

Assay for purified ClpP fractions. ClpP containing fractions were identified by a fluorogenic peptidase activity assay in buffer FP (50 mM Tris pH 8.0, 100 mM KCl, 1 mM DTT). In short 10 μ L sample were added to 39 μ L buffer FP in a black CELLSTAR[®] 96-well flat-bottom plate followed by 1 μ L 10 mM *N*-succinyl-Leu-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin (SLY-AMC)^[2]. Fluorescence of released AMC was excited at 340 nm and recorded at 450 nm and 25°C with a TECAN GENios Pro.

Structure determination. Crystals for *S. aureus* ClpP were grown at 20°C in hanging drops using as reservoir solution 1.8 M ammonium sulfate and 100 mM sodium acetate pH 4.5. Crystals were cryo-protected by a stepwise transfer to reservoir solution containing 7-20% PEG 400, and flash-cooled by plunging into liquid nitrogen. Crystals reached a size of 300 μ m x 300 μ m x 300 μ m. Diffraction data were collected at the Swiss Light Source and processed with XDS^[3] (Table 1). The structure was solved by molecular replacement with AMORE^[4], using the *Sp*ClpP structure as a search model. The model was built with COOT^[5] and refined with PHENIX^[6] and BUSTER^[7] (Table 1).

Site-directed mutagenesis. Mutagenesis was carried out with the QuikChange[®] II site-directed mutagenesis kit (Stratagene). Primers were designed according to the QuikChange[®] II site-directed mutagenesis kit (Stratagene) and used to for a full plasmid PCR of the ClpP carrying pDONR[™]201 vector with *PfuUltra* HF polymerase.

ClpP E135A

Forward primer: 5'-GCTCAAGGACAAGCAACTGCAATCGAAATTGCTGCAAAT-3'

Reverse primer: 5'-ATTTGCAGCAATTTTCGATTGCAGTTGCTTGTCTTGAGC-3'

ClpP E135R

Forward primer: 5'-GGTGCTCAAGGACAAGCAACTAGAATCGAAATTGCTGCAAA
TCA-3'

Reverse primer: 5'-TGATTTGCAGCAATTTTCGATTCTAGTTGCTTGTCTTGAGC
ACC-3'

ClpP L144G

Forward primer: 5'-GAAATCGAAATTGCTGCAAATCACATTGGAAAAACACGTGAAA
AATTAAACCGCAT-3'

Reverse primer: 5'-ATGCGGTTTAATTTTTTCACGTGTTTTTCCAATGTGATTTGCAGC
AATTTTCGATTTTC-3'

ClpP L144M

Forward primer: 5'-GAAATCGAAATTGCTGCAAATCACATTATGAAAACACGTG
AAAAATTAACCGCATT-3'

Reverse primer: 5'-AATGCGGTTTAATTTTTTCACGTGTTTTTCATAATGTGATTTG
CAGCAATTTTCGATTTTC-3'

ClpP L144R

Forward primer: 5'-GAAATCGAAATTGCTGCAAATCACATTAGAAAACACGTG
AAAAATTAACCGCAT-3'

Reverse primer: 5'-ATGCGGTTTAATTTTTTCACGTGTTTTTCTAATGTGATTTGCA
GCAATTTTCGATTTTC-3'

ClpP L144E

Forward primer: 5'-CAACTGAAATCGAAATTGCTGCAAATCACATTGAGAAAACACG
TGAAAATTAACCGCATTTTATC-3'

Reverse primer: 5'-GATAAAATGCGGTTTAATTTTTTCACGTGTTTTTCTCAATGTGAT
TTGCAGCAATTTTCGATTTTCAGTTG-3'

ClpP G127A G128A G131A

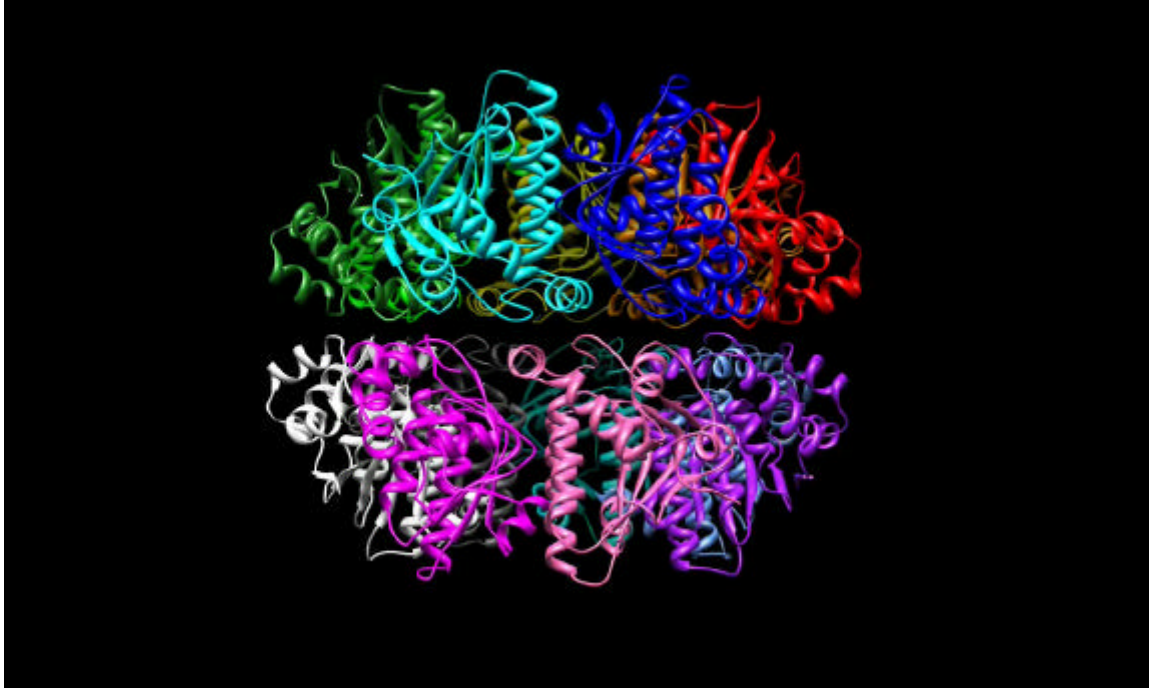
Forward primer: 5'-GTAATGATTCACCAACCATTAGCTGCTGCTCAAGCACAAG
CAACTGAAATCGAAATTGCT-3'

Reverse primer: 5'-AGCAATTTTCGATTTTCAGTTGCTTGTGCTTGAGCAGCAGCTA
ATGGTTGGTGAATCATTAC-3'

Residual wild type parent plasmid was digested by Dpn I and the mutants were transformed into *E. coli* XL1-Blue cells. Successful ClpP mutants were cloned into the expression vector pDest007 by Gateway[®] Technology (Invitrogen) and expressed in BL21 cells as detailed above. Cells harvested from 1 L expression culture were lysed by French Press in 20 mL of buffer SP (50 mM HEPES-KOH pH 7.5 (4°C), 100 mM KCl, 1mM EDTA, 10% glycerol) and centrifuged for 40 min at 18000 rpm. The supernatant was loaded on a StrepTrap[™] HP 1 mL column (GE Healthcare) by an ÄKTA[™]purifier and eluted with buffer SP containing 2.5 mM desthiobiotin. Pooled peak fractions were equilibrated on buffer SP and concentrated to 2 mg/mL.

Activity assay. Wild type and mutant ClpPs were concentrated to 2 mg/mL stocks in buffer C (50 mM HEPES-KOH pH 7.5, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol). 7-Amido-4-methylcoumarin (AMC) release was calibrated on incubation of different concentrations of *N*-succinyl-Leu-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin (SLY-AMC)^[8] with ClpP until all substrate was consumed. The calibration experiments were carried out with reaction mixtures of 186 μ L buffer D (50 mM MES pH 7.0, 100 mM KCl), 4 μ L wild type ClpP (2 mg/mL) and 10 μ L SLY-AMC DMSO stocks in concentrations ranging from 20 μ M to 100 μ M giving final concentrations of 1 μ M, 2 μ M, 3 μ M, 4 μ M, and 5 μ M. The fluorescence of 50 μ L aliquots in black CELLSTAR[®] 96-well flat-bottom plates was measured after full consumption of the SLY-AMC substrate in triplicates with 340 nm excitation and 450 nm emission wave lengths by an Infinite 200Pro microplate reader (Tecan). For Michaelis-Menten kinetics a SLY-AMC mix and a ClpP mix was prepared for every concentration and for all ClpPs, respectively. The SLY-AMC mixes were prepared from 50 μ L SLY-AMC stock in DMSO and 750 μ L buffer D and the ClpP mixes from 26 μ L ClpP 2 mg/mL stocks and 234 μ L buffer D. Assay reactions were initialized by mixing 10 μ L ClpP mix with 40 μ L SLY-AMC mix in black CELLSTAR[®] 96-well flat-bottom plates resulting in final concentrations of 200 μ M, 300 μ M, 400 μ M, 500 μ M, 600 μ M, and 750 μ M SLY-AMC. Fluorescence was recorded for 10 cycles every 60 seconds at 32°C. Kinetic constants were determined by linear regression of Hanes Woolf plots.

Supplemental Movie:



REFERENCES

- [1] T. Böttcher, S. A. Sieber, *J Am Chem Soc* **2008**, *130*, 14400-14401.
- [2] M. W. Thompson, M. R. Maurizi, *J Biol Chem* **1994**, *269*, 18201-18208.
- [3] W. Kabsch, *J Appl Crystallogr* **1993**, *26*, 795-800.
- [4] J. Navaza, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2001**, *57*, 1367-1372.
- [5] P. Emsley, K. Cowtan, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2004**, *60*, 2126-2132.
- [6] P. V. Afonine, R. W. Grosse-Kunstleve, P. D. Adams, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2005**, *61*, 850-855.
- [7] E. Blanc, P. Roversi, C. Vornrhein, C. Flensburg, S. M. Lea, G. Bricogne, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2004**, *60*, 2210-2221.
- [8] M. W. Thompson, S. K. Singh, M. R. Maurizi, *J Biol Chem* **1994**, *269*, 18209-18215.

Hintergrundinformationen

Proteinherstellung. Das Gen für *S. aureus* NCTC 8325 ClpP (Protein ID: YP_499347) wurde in den Vektor pDest007 kloniert, wodurch ein C-terminaler Streptavidin Tag an ClpP erhalten wurde^[1]. ClpP wurde für 2 h bei 37 °C in *E. coli* BL21 (DE3) RIL Zellen (Agilent) exprimiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet, in 50 ml Puffer A (50 mM Tris pH 7.5, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, 10% (v/v) Glycerin) resuspendiert und durch French Press lysiert. Nach Zentrifugation wurden 0.1% Polyethylenimin (PEI) pH 8.0 hinzugegeben und die Proteine durch Zentrifugation vom Präzipitat getrennt. Der Überstand wurde auf 100 mM KCl eingestellt und das Protein auf eine HiTrap Q HP Säule (GE Healthcare) geladen, die mit Puffer A mit 100 mM KCl equilibriert worden war. Das Protein wurde in einem linearen Gradienten von 0.1 M KCl auf 0.4 M KCl in 26 Säulenvolumina (130 mL, 2 mL/min) eluiert. ClpP wurde hierbei in der HiTrap™Q HP Fraktion zwischen 0.22 M und 0.28 M KCl erhalten. Die vereinigten ClpP Fraktionen wurden anschließend an StrepTactin® Superflow® beads (IBA) aufgereinigt. Das reine Protein wurde für die Kristallisationsexperimente auf 5.5 mg/mL in Puffer B (50 mM Tris pH 7.5, 200 mM NaCl, 5 mM DTT) aufkonzentriert.

Schnelltest für ClpP Fraktionen. ClpP enthaltende Fraktionen wurden durch einen fluorogenen Peptidase-Aktivitätstest in Puffer FP (50 mM Tris pH 8.0, 100 mM KCl, 1 mM DTT) identifiziert. Hierbei wurden 10 µL einer Probe zu 39 µL Puffer FP in einer schwarzen CELLSTAR® 96-well Flachbodenplatte gegeben, gefolgt von 1 µL 10 mM *N*-Succinyl-Leu-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin (SLY-AMC)^[2]. Die Fluoreszenz von freigesetztem AMC wurde bei 340 nm angeregt und bei 450 nm an einem TECAN GENios Pro bei 25°C gemessen.

Strukturbestimmung. *S. aureus* ClpP Kristalle wurden bei 20°C in Hängetropfen mit einer Reservoirlösung von 1.8 M Ammoniumsulfat und 100 mM Natriumacetat pH 4.5 erhalten. Die Kristalle wurden schrittweise durch einen Transfer in Reservoirlösungen mit 7-20% PEG 400 frostgeschützt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Größe der Kristalle erreichte bis zu 300 µm x 300 µm x 300 µm. Diffraktionsdaten wurden an der Swiss Light Source gesammelt und mit XDS^[3] prozessiert (Tabelle 1). Die Struktur wurde durch “Molecular Replacement“ mit

AMORE^[4] unter Verwendung der *Sp*ClpP als Suchmodell gelöst. Das Modell wurde mit COOT^[5] erstellt und mit PHENIX^[6] und BUSTER^[7] verfeinert (Tabelle 1).

Ortsspezifische Mutagenese. Die Mutagenese erfolgte mit dem QuikChange[®] II site-directed mutagenesis kit (Stratagene). Die Primer wurden gemäß dem QuikChange[®] II site-directed mutagenesis kit (Stratagene) geplant und für eine Vollplasmid-PCR des ClpP tragenden Vektors pDONRTM201 mit *PfuUltra* HF Polymerase eingesetzt.

ClpP E135A

Vorwärts Primer: 5'-GCTCAAGGACAAGCAACTGCAATCGAAATTGCTGCAAAT-3'

Rückwärts Primer: 5'-ATTTGCAGCAATTTTCGATTGCAGTTGCTTGTCCCTTGAGC-3'

ClpP E135R

Vorwärts Primer: 5'-GGTGCTCAAGGACAAGCAACTAGAATCGAAATTGCTGCAAA
TCA-3'

Rückwärts Primer: 5'-TGATTTGCAGCAATTTTCGATTCTAGTTGCTTGTCCCTTGAGC
ACC-3'

ClpP L144G

Vorwärts Primer: 5'-GAAATCGAAATTGCTGCAAATCACATTGGAAAAACACGTGAAA
AATTAAACCGCAT-3'

Rückwärts Primer: 5'-ATGCGGTTTAATTTTTTCACGTGTTTTTCCAATGTGATTTGCAGC
AATTTTCGATTTTC-3'

ClpP L144M

Vorwärts Primer: 5'-GAAATCGAAATTGCTGCAAATCACATTATGAAAACACGTG
AAAAATTAACCGCATT-3'

Rückwärts Primer: 5'-AATGCGGTTTAATTTTTTCACGTGTTTTTCATAATGTGATTTG
CAGCAATTTTCGATTTTC-3'

ClpP L144R

Vorwärts Primer: 5'-GAAATCGAAATTGCTGCAAATCACATTAGAAAAACACGTG
AAAAATTAACCGCAT-3'

Rückwärts Primer: 5'-ATGCGGTTTAATTTTTTCACGTGTTTTTCTAATGTGATTTGCA
GCAATTTTCGATTTTC-3'

ClpP L144E

Vorwärts Primer: 5'-CAACTGAAATCGAAATTGCTGCAAATCACATTGAGAAAACACG
TGAAAAATTAACCGCATTTTATC-3'

Rückwärts Primer: 5'-GATAAAATGCGGTTTAATTTTTTCACGTGTTTTCTCAATGTGAT
TTGCAGCAATTTTCGATTTTCAGTTG-3'

ClpP G127A G128A G131A

Vorwärts Primer: 5'-GTAATGATTCACCAACCATTAGCTGCTGCTCAAGCACAAG
CAACTGAAATCGAAATTGCT-3'

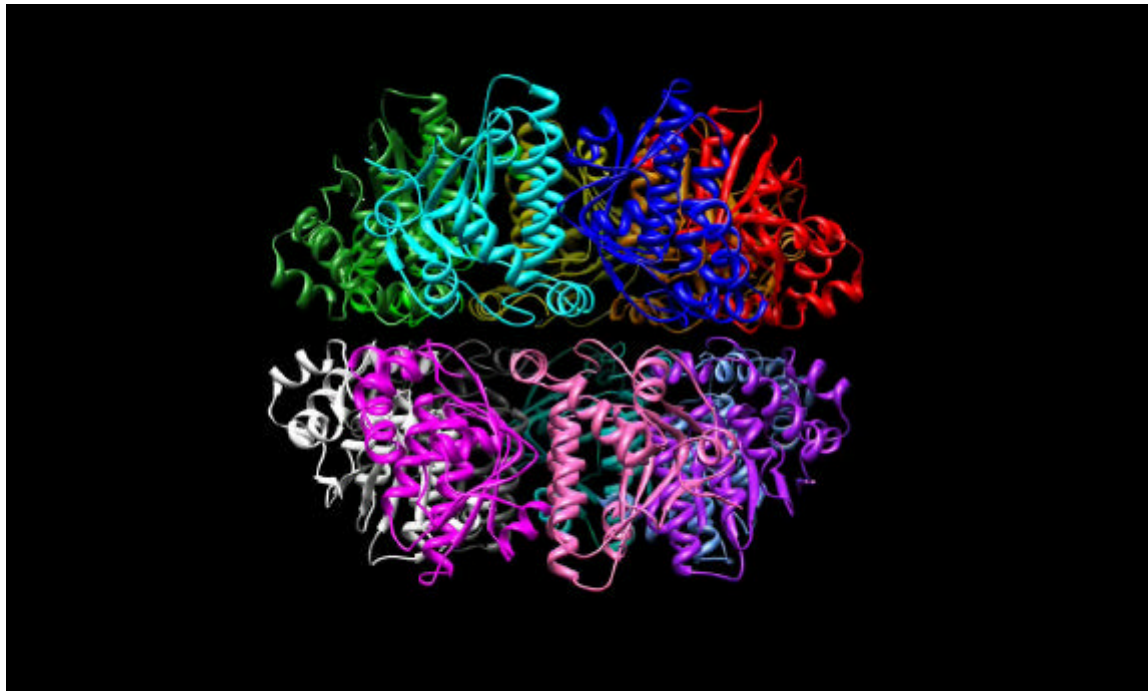
Rückwärts Primer: 5'-AGCAATTTTCGATTTTCAGTTGCTTGTGCTTGAGCAGCAGCTA
ATGGTTGGTGAATCATTAC-3'

Übrig gebliebenes Wildtyp-Plasmid wurde durch Dpn I verdaut und die mutierten Plasmide wurde in *E. coli* XL1-Blue Zellen transformiert. Erfolgreiche ClpP Mutanten wurden in den Expressionsvektor pDest007 mittels Gateway[®] Technologie (Invitrogen) umkloniert und in BL21 Zellen wie oben beschrieben exprimiert. Die geerntete Menge Zellen aus 1 L Expressionskultur wurde durch French Press in 20 mL Puffer SP (50 mM HEPES-KOH pH 7.5 (4°C), 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 10% Glycerin) lysiert und für 40 min bei 18000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine StrepTrap[™] HP 1 mL Säule (GE Healthcare) mit einem ÄKTA[™]purifier geladen und mit Puffer SP mit 2.5 mM Desthiobiotin eluiert. Die gesammelten ClpP Fraktionen wurden auf Puffer SP umgepuffert und auf 2 mg/mL konzentriert.

Aktivitätstest. Wildtyp und ClpP Mutanten wurden auf 2 mg/mL als Stammlösungen auf Puffer C (50 mM HEPES-KOH pH 7.5, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 10% Glycerin) umgepuffert. Die Freisetzung von 7-Amido-4-methylcoumarin (AMC) wurde auf die Inkubation verschiedener Konzentrationen von *N*-Succinyl-Leu-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin (SLY-AMC)^[8] mit ClpP bis zum vollständigen Substratumsatz kalibriert. Die Kalibrationsexperimente wurden mit Reaktionsmischungen durchgeführt, bestehend aus 186 µL Puffer D (50 mM MES pH 7.0, 100 mM KCl), 4 µL Wildtyp ClpP (2 mg/mL) und 10 µL SLY-AMC DMSO Stammlösungen in Konzentrationen von 20 µM bis 100 µM und damit finalen Konzentrationen von 1 µM, 2 µM, 3 µM, 4 µM, und 5 µM. Die Fluoreszenz von jeweils 50 µL Aliquoten wurde in schwarzen CELLSTAR[®] 96-well Flachbodenplatten nach vollständigem Verbrauch des SLY-AMC Substrats in Triplikaten bei 340 nm Anregungs- und 450 nm Emissionswellenlänge an einem Infinite 200Pro microplate reader (Tecan) gemessen. Für die Michaelis-Menten Kinetiken wurde eine SLY-AMC Mischung und eine ClpP Mischung entsprechend für jede Konzentration und für

alle ClpP Varianten vorbereitet. Die SLY-AMC Mischungen wurden aus 50 μL SLY-AMC Stammlösungen in DMSO und 750 μL Puffer D und die ClpP Mischungen aus 26 μL ClpP 2 mg/mL Lösungen und 234 μL Puffer D hergestellt. Die Reaktionen wurden durch Mischen von 10 μL ClpP Mischung mit 40 μL der SLY-AMC Mischung in schwarzen CELLSTAR[®] 96-well Flachbodenplatten initiiert. Dies ergab Endkonzentrationen von 200 μM , 300 μM , 400 μM , 500 μM , 600 μM , und 750 μM SLY-AMC. Die Fluoreszenz wurde in 10 Zyklen alle 60 Sekunden bei 32°C aufgenommen. Kinetische Konstanten wurden durch lineare Regression von Hanes Woolf Auftragungen ermittelt.

Animation:



Literatur

- [1] T. Böttcher, S. A. Sieber, *J Am Chem Soc* **2008**, *130*, 14400-14401.
- [2] M. W. Thompson, M. R. Maurizi, *J Biol Chem* **1994**, *269*, 18201-18208.
- [3] W. Kabsch, *J Appl Crystallogr* **1993**, *26*, 795-800.
- [4] J. Navaza, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2001**, *57*, 1367-1372.
- [5] P. Emsley, K. Cowtan, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2004**, *60*, 2126-2132.
- [6] P. V. Afonine, R. W. Grosse-Kunstleve, P. D. Adams, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2005**, *61*, 850-855.
- [7] E. Blanc, P. Roversi, C. Vornrhein, C. Flensburg, S. M. Lea, G. Bricogne, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2004**, *60*, 2210-2221.
- [8] M. W. Thompson, S. K. Singh, M. R. Maurizi, *J Biol Chem* **1994**, *269*, 18209-18215.