

文章编号: 1000-6281(2008)01-0051-06

变性的 α -lactalbumin 诱导 DegP 形成十二聚体

陈 果, 江建森, 隋森芳*

(清华大学生命科学与技术系生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100084)

摘 要: 大肠杆菌热休克蛋白 DegP, 也称作 HtrA 或蛋白酶 Do, 具有分子伴侣和蛋白酶两种活性。缺失 DegP 会导致大肠杆菌在高温下不能存活。DegP 的晶体结构表明, 它是由两个紧密折叠的三聚体松散地结合在一起形成的六聚体。作者在分子筛柱层析的实验中发现 DegP 六聚体与变性的 α -lactalbumin 共孵育后能全部转变为更大的寡聚体。进一步用负染电镜及单颗粒三维重构方法对该寡聚体进行结构分析, 发现它是由 4 个三聚体组成的具有四面体对称性的十二聚体笼形结构。文章还对 DegP 十二聚体的结构与功能的关系展开了初步的讨论。

关键词: 热休克蛋白 DegP; 单颗粒技术; 电子显微镜

中图分类号: Q71; Q336 **文献标识码:** A

在热休克等胁迫条件下细胞中会产生大量变性蛋白, 而这些变性蛋白的积累会对细胞产生严重的毒害。作为一种保护机制, 细胞会提高多种分子伴侣蛋白和蛋白酶的表达水平以保护或清除这些变性蛋白^[1,2]。大肠杆菌热休克蛋白 DegP (又称作 HtrA 或蛋白酶 Do) 就是这样一种胁迫诱导的蛋白, 它对于大肠杆菌在高温下的生存是必须的。它的保护功能可能体现在捕捉并清除去折叠的蛋白^[3~6]。DegP 对于去折叠的蛋白具有两种不同的活性: 分子伴侣活性和蛋白酶活性。它的蛋白酶活性不依赖于 ATP, 在室温下活性微弱, 随着温度升高活性迅速提高, 在 55℃ 时达到最高^[7~11]。

DegP 的晶体结构被解析后表明它在晶体中以六聚体的形式存在, 而六聚体又是由两个三聚体交错结合而形成。每个单体亚基由一个类胰蛋白酶结构域和两个 PDZ (PSD-95, *Drosophila melanogaster* Disc Large protein and the Zonula occludens 1 protein) 结构域构成^[12]。其中蛋白酶机构域对于分子伴侣活性是必需的, 而 PDZ1 和 PDZ2 结构域则分别认为与结合底物和维持六聚体的寡聚结构有关^[9,13~15]。晶体结构表明, 在两个三聚体之间存在一个狭窄的空腔, 蛋白酶的催化位点正是位于这个空腔中。然而由于催化位点完全被附近的几个 loop 环所封闭, 人们推测 DegP 六聚体代表的是一种失活的构象^[12]。最近一篇报道指出, 删除了 LA loop 的 DegP 不再形

成六聚体, 而是以三聚体的形式存在, 并保持了大部分分子伴侣和蛋白酶的活性, 因而在一定程度上暗示了六聚体的结构对于 DegP 的活性发挥可能不是必需的^[14]。此外, 如大肠杆菌 DegS 和人 HtrA2 等 DegP 同源蛋白的晶体结构是三聚体的寡聚结构^[16~18]。迄今为止, DegP 发挥蛋白酶和分子伴侣活性时处于何种寡聚状态仍然是个悬而未决的问题。

作者发现 DegP 与变性的 α -lactalbumin 结合后形成比六聚体更大的寡聚体。对这种寡聚结构进行电镜单颗粒三维重构后发现它是一种十二聚体, 由 4 个三聚体构成并具有四面体对称性, 这 4 个三聚体紧密结合在一起形成笼形的结构。这种由底物蛋白诱导形成的笼形结构很可能对于 DegP 发挥分子伴侣和蛋白酶这两种活性是非常重要的。

1 材料与方法

1.1 材料

野生型的 *degP* 构建于 pTdeg 载体, 来自 Betton 博士^[13]。通过 PCR 纯化质粒并用 NcoI 和 XhoI 双酶切后, 连接到带有 His tag 标记的 pET-28a 载体上。*degP*(S210A) 突变体通过 pET-28a 衍生物点突变得。 α -lactalbumin 购自 Sigma 公司。Lysozyme 购自 Amersco 公司。Dithiothreitol (DTT) 来自 Merck 公司。本文实验中使用的其他化学试剂均为分析纯。

收稿日期: 2007-05-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 30330160)。

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 30330160)。

作者简介: 陈果 (1981-), 女 (汉族), 重庆人, 硕士。E-mail: gail00@mails.tsinghua.edu.cn。

* 通讯作者: 隋森芳 (1943-), 男 (汉族), 教授。E-mail: suisf@mail.tsinghua.edu.cn。

1.2 DegP(S210A)蛋白的表达和纯化

蛋白在 BL-21 (DE3) 菌株中表达, 并通过亲和层析纯化^[19]。菌株在 37℃ 下含有 50 $\mu\text{g/ml}$ 卡那霉素的 LB 培养基中生长, 当 A_{600} 吸光度在 0.8~1.0 之间时, 用 0.1 mmol/L 的 IPTG 诱导 4 h。菌液 5 000 rpm 离心 10 min, 沉淀用悬浮液 (50 mmol/L Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 , pH 7.6, 50 mmol/L NaCl, 20 mmol/L imidazole, 1 $\mu\text{g/ml}$ pepstatin A) 悬浮。超声波裂解细菌。裂解液 15 000 rpm 离心 50 min, 上清加入 Ni-NTA 亲和柱。分别用 100 ml 的缓冲液 A (50 mmol/L Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 , pH 7.6, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L imidazole) 和缓冲液 B (50 mmol/L Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 , pH 7.6, 1 mol/L NaCl, 20 mmol/L imidazole) 洗柱子。最后用洗脱液 (50 mmol/L Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 , pH 7.6, 50 mmol/L NaCl, 250 mmol/L imidazole) 收集蛋白。提纯得到的成分(>95%)通过 SDS-PAGE 检测。

1.3 分子筛柱层析色谱(size exclusion chromatography, SEC)

SEC 均在 4℃ 完成。使用 AKTA FPLC 系统和预先装柱的 Superdex 200 10/300 GL 柱 (GE Healthcare Life Sciences)。上清 100 μl 样品, 使用洗脱液 (50 mmol/L Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 , pH 7.6, 50 mmol/L NaCl) 洗脱。通过 SEC 得到 DegP 蛋白的六聚体用于进一步实验。纯化的最终蛋白浓度通过 Pierce 公司的蛋白定量试剂盒检测。

1.4 DegP-底物复合体的制备

为了得到 DegP-底物复合体, 纯化的 DegP (S210A) (1.0 mg/ml) 蛋白按 1:2 (DegP monomer: α -lactalbumin) 的摩尔比加入过量的 α -lactalbumin 中, 在 42℃ 孵育 30 min。此前在溶液中加入终浓度为 20 mmol/L 的 DTT 还原 α -lactalbumin。样品离心, 去掉寡聚物, 然后用于 SEC 或者制备电镜样品。

1.5 电镜和图像处理

电镜样品用 1% 的醋酸铀负染后在 Philips CM120 BioTWIN 型透射电镜下观察。工作电压为 100 kV, 放大倍数为 52 000X。底片采用乐凯透射电镜软片, 冲洗后用 Nikon Coolscan 9000ED 型扫描仪扫描, 扫描步长为 1.27 μm 。

DegP(S210A)与底物结合复合体的单颗粒重构计算使用 EMAN^[19] 软件完成。操作步骤根据使用手册完成。简言之, 首先利用 Boxer 程序将粒子图像从底片中挑选出来并使用 ctfit 命令做 CTF 校正。校正过的图像通过 startnrclasses 命令计算得到没有参

比的分类平均图。大约 10 个不同的平均分类图被选择并利用 startAny 命令计算得到初始模型。经过多次优化, 综合考虑实验误差确定模型的对称性。在对称性的基础上再进行进一步优化。

晶体模型同电镜三维重构图的比对结果是使用 UCSF Chimera 根据本地最优化策略(local optimization strategy)^[19] 获得的。

2 结果

2.1 DegP 六聚体与变性的 α -lactalbumin 结合后形成大的寡聚体

由于 DegP 具有蛋白酶活性, 能够迅速降解底物蛋白^[8], 因此作者利用在催化中心发生了点突变而完全丧失了蛋白酶活性的突变蛋白 DegP (S210A) 来获得 DegP 与底物共同形成的复合体。 α -lactalbumin 的二硫键被 DTT 还原后肽链发生解折叠从而可被 DegP 水解, 因此 α -lactalbumin 用作在体外检测 DegP 蛋白酶活性的底物^[10]。将适量 DegP (S210A)、 α -lactalbumin 和 DTT 混合后在 42℃ 孵育 30 min, 然后用分子筛层析柱进行洗脱 (图 1), 发现 DegP 六聚体的洗脱峰消失, 而出现了新的分子量约 500 KDa 的洗脱峰。这一结果暗示了在底物的作用下 DegP 六聚体形成了新的寡聚体。DegP 六聚体的分子量为 288 KDa, 这种新出现的寡聚体的分子量约是它的 2 倍。

由于 DegP 对于 *E. coli* 的重要性主要体现在高温下 (例如 42℃)^[3, 19], 因此本文选择了在 42℃ 下共孵育 DegP 与 α -lactalbumin。实际上, 在其它温度下, 例如在室温时作者也得到了类似的结果。

2.2 DegP 寡聚体负染样品的电镜单颗粒三维重构

因为受分子筛柱层析的分辨率所限, 本文并不能根据前面的实验数据得到寡聚体的准确构成。电镜单颗粒三维重构是最近一二十年迅速发展起来的研究蛋白质结构的方法, 尤其适用于研究大的寡聚蛋白或蛋白复合体, 如核糖体^[20, 21], 因此作者利用这种方法研究 DegP 寡聚体的结构。

收集从分子筛洗脱的 DegP 寡聚体的组分, 用 1% 醋酸铀染色后用电镜观察, 结果如图 2 所示。图 2a 是作为参照的 DegP 六聚体, 蛋白颗粒的平均直径约 12 nm, 与六聚体晶体结构的结果类似。图 2b 是底物诱导形成的 DegP 寡聚体, 经计算其平均直径约 14 nm, 大于六聚体的直径, 且具有规则的轮廓, 暗示寡聚体可能具有稳定的结构。

作者从电镜照片中挑选了 992 个蛋白粒子用于单颗粒分析。将这些粒子图像进行无参照的分类并

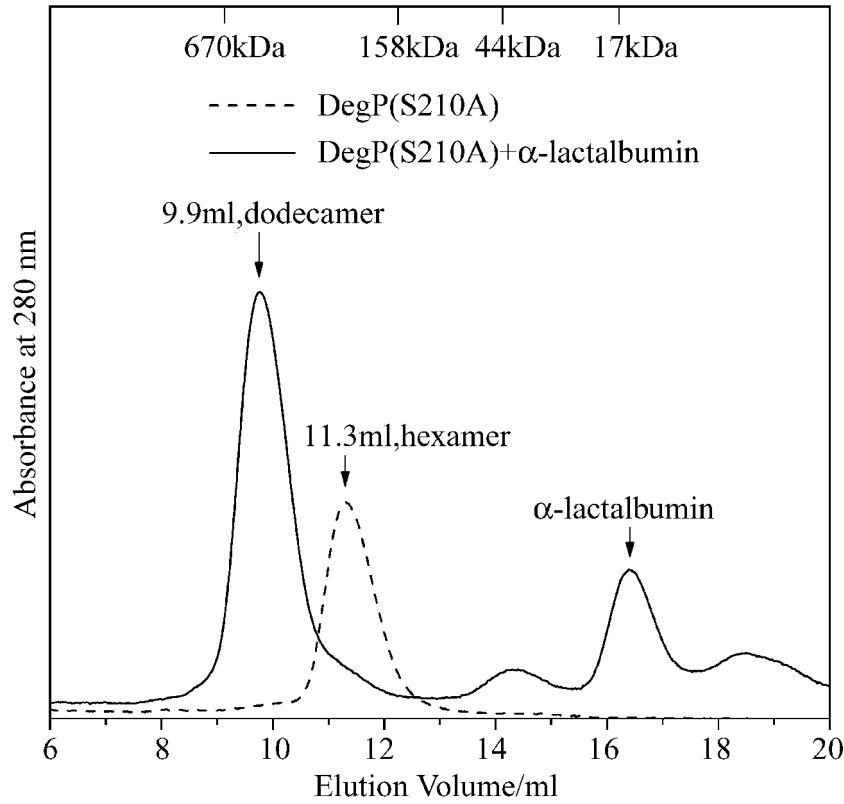


图 1 DegP 结合到解折叠的 α -lactalbumin 后聚集成较大的寡聚体。分子筛层析洗脱图示 DegP(S210A) 的六聚体和与解折叠的 α -lactalbumin 孵育的 DegP(S210A)。向下的箭头指示 DegP(S210A) 的六聚体和十二聚体、以及过量的 α -lactalbumin 的洗脱体积。

Fig. 1 DegP is converted to larger oligomers in binding to unfolded α -lactalbumin. Gel filtration elution profiles of both free hexameric form of DegP(S210A) and DegP(S210A) incubated with unfolded α -lactalbumin. Eluted positions of the hexameric and dodecameric forms of DegP(S210A), as well as that of excessive α -lactalbumin are indicated by the downward arrows.

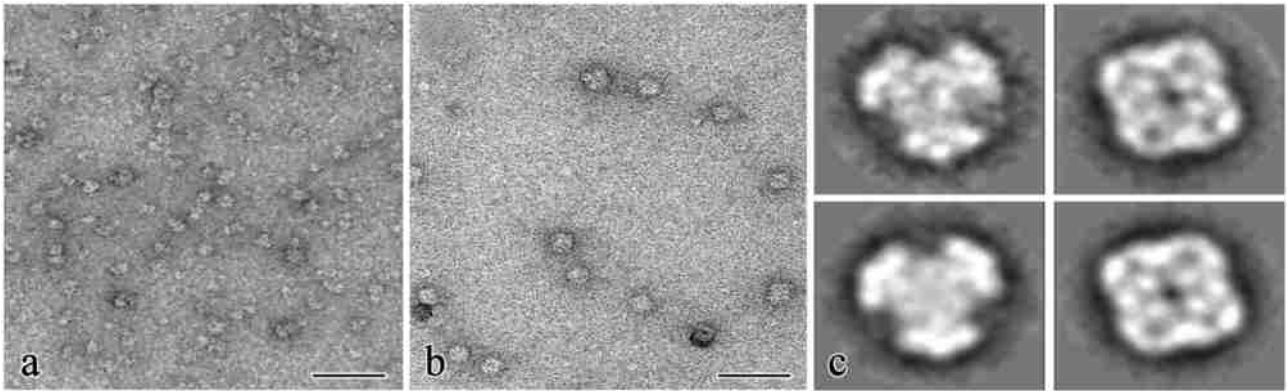


图 2 这种大的寡聚体具有规则的对称轮廓。a: 负染的 DegP 六聚体的电镜照片作为参照。蛋白粒子的平均直径是 12 nm, Bar=50 nm; b: DegP(S210A) 与解折叠的 α -lactalbumin 孵育后的大寡聚体负染电镜照片。这种粒子的平均直径测得为 14 nm, Bar=50 nm; c: 这种大的寡聚体粒子的二维平均图示例, 显示出 3 次和 2 次旋转对称性。第一行显示没有添加对称性的平均图; 第二行显示添加了对称性的平均图。正方形外框边长为 23.4 nm。

Fig. 2 The large oligomers have regular and symmetric shape. a: The negatively stained electron micrograph of DegP hexamers is shown as a control. The average diameter of the protein particles is about 12 nm, Bar=50 nm; b: The negatively stained electron micrograph of the large oligomers of DegP(S210A) incubated with unfolded α -lactalbumin. The average diameter of the particles is calculated to be 14 nm, Bar=50 nm; c: Representative two-dimensional average maps of the large oligomer particles, showing 3-fold and 2-fold symmetries of the particles. The top row shows the average maps without symmetric average applied; the bottom row shows the average maps with symmetric average applied. The box side length is 23.4 nm.

计算得到一系列的二维平均图。其中一些平均图显示出了强烈的结构特征,例如具有 3 次和 2 次的旋转对称性(图 2c)。这些对称性信息将有利于正确的进行单颗粒三维重构。

挑选出约 10 个信噪比相对较高并具有代表性的二维平均图,利用共价线(common line)方法计算得到了一个粗糙的初始模型。同样的,即使在这个粗糙的模型也表现出了 3 次和 2 次的旋转对称性,在结构优化时分别加入这两种对称性均可以改善三

维模型的质量。但是将这两种对称性以垂直的方式(D³对称性)同时加入时,反而使三维模型完全破坏。经过仔细分析后发现在这个寡聚体的三维模型中 C₂ 和 C₃ 的对称轴并不互相垂直,并具有多个 C₂ 和 C₃ 的对称轴,形成类似四面体的空间结构。因此作者尝试在结构优化时加入四面体对称性,发现此时得到的模型具有最精细的结构。结构优化循环持续进行,直到生成的三维模型收敛到一个稳定的结构并不再发生变化为止,于是得到了最终的三维

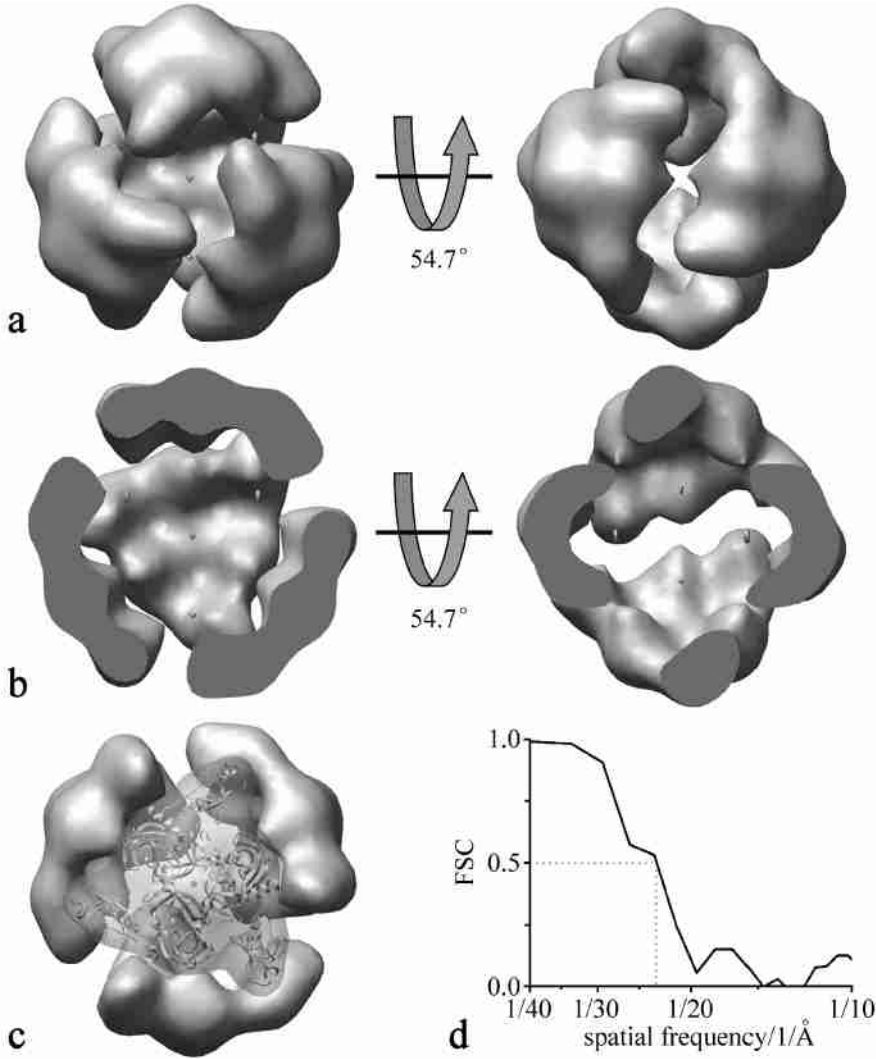


图 3 DegP 十二聚体的三维重构模型。a:十二聚体的轮廓直观图。图示沿着 3 次和 2 次对称轴展示;b:十二聚体的内部结构截面图;c:一个 DegP 三聚体的原子模型叠加到电镜图上,能够看出三聚体非常吻合;d:利用奇数和偶数序号的粒子分别进行三维重构,根据得到的两个三维模型之间的傅立叶环相关(FSC)曲线计算重构分辨率(阈值取 FSC = 0.5)。

Fig. 3 The reconstructed three-dimensional model of the dodecamer of DegP. a: Surface rendered views on the maps of dodecamer. The views are along the 3-fold and 2-fold axes for easier visual interpretation; b: The map is clipped for viewing the internal structures of the dodecamer; c: An atomic model of DegP trimer is superimposed on the electron microscopic map, showing the nice fitting of the trimer; d: Fourier shell correlation (FSC) curve calculated between models reconstructed from the even- and odd-numbered particles. The resolution is determined at 0.5 criteria.

模型(图 3a)。利用常用的奇偶测验的方法^[22]评估得到此三维重构的分辨率约 2.3 nm (FSC=0.5 时,图 3d)。

在这个三维结构中,4 个三角形的结构单元围成一个类似笼形的结构(图 3b),其长轴直径约 14 nm,中心是一明显的空腔。与 DegP 六聚体的晶体结构相比较后发现,这种三角形结构单元对应于六聚体中的一个三聚体(图 3c),在电镜重构模型中每个三聚体的蛋白酶结构域和 PDZ1 结构域可以清晰的辨认出来。也就是这种底物诱导的寡聚结构是一种具有四面体对称性的十二聚体。

3 讨论

在本文工作中发现变性的 α -lactalbumin 能诱导 DegP 形成大的寡聚体,且电镜的结构分析表明这种寡聚体具有笼形结构的十二聚体, DegP 三聚体是其结构单元。此前发表的文献指出当从 *E. coli* 中纯化 DegP 时尽管 DegP 主要是六聚体,但总有少量的 DegP 以更高的寡聚形式存在^[7],并通过生化分析还指出这种寡聚体可能是十二聚体^[14,15]。但并未提出十二聚体的结构,且其生理意义也不清楚。本文在体外实验中纯化得到了十二聚体,且利用电镜单颗粒重构的方法解析出了它的三维结构。

本文实验中使用的是突变蛋白 DegP (S210A),这种突变蛋白除了丧失了蛋白酶活性以外,其分子伴侣活性和其他生化性质与野生型蛋白基本相同^[9,11]。因此得到的底物诱导的寡聚体可以看作是发挥蛋白酶活性的途径被阻断后, DegP 结合底物后准备发挥蛋白酶活性时的中间状态。也就是说十二聚体可能是 DegP 在发挥蛋白酶活性时的构象状态。DegP 的晶体结构表明它是由两个三聚体构成的六聚体,其蛋白酶催化中心被包裹在六聚体内部而底物蛋白很难进入到活性中心,并且催化中心被几个肽链的 loop 环完全封闭而处于失活的构象^[12]。因此目前得到的六聚体的结构很难解释 DegP 发挥活性的机理, DegP 在发挥活性时可能经历了明显的构象变化^[23]。在 DegP 十二聚体的结构中,三聚体围成笼形结构的外壁,中间有一空腔可容纳很大的底物。在十二聚体中催化中心不再像在六聚体中那样被对面三聚体的 LA loop 所遮盖,即在十二聚体中催化中心可能是处于被激活的状态。

DegP 的特殊之处在于它同时具有两种截然不同的活性——分子伴侣活性和蛋白酶活性^[9]。已详细研究了 GroEL 和 proteosome 分别具有这两种活

性,它们均具有笼形的结构,蛋白在腔中被折叠或降解^[24,25]。而十二聚体所具备的笼形结构也暗示了它可能具有类似的机制以发挥分子伴侣和蛋白酶活性。不同之处在于 GroEL 和 proteosome 的笼形寡聚结构是预先形成并不依赖于底物蛋白的,而 DegP 十二聚体的形成是底物诱导的。这种机制可能有助于 DegP 仅在胁迫环境造成大量蛋白变性时才发挥活性以免不必要的降解非变性蛋白。

DegP 十二聚体的笼形结构的意义可能还体现在另一方面。当体内出现大量变性蛋白时,变性蛋白很容易发生聚集而对细胞产生毒害。DegP 与变性蛋白结合后迅速形成十二聚体从而避免聚集的发生,这对于变性蛋白是最初步的保护。在十二聚体中,底物可以进一步选择性地重新折叠成有活性的构象或水解成无毒害的肽链片段。这种精确的寡聚结构及构象变化的调节对于 DegP 在胁迫条件下的快速响应以保护细胞的生长可能具有重要意义。

参考文献:

- [1] Lindquist S, Craig E A. The heat-shock proteins[J]. Annu Rev Genet, 1988, 22: 631—677.
- [2] Gottesman S. Proteases and their targets in *Escherichia coli* [J]. Annu Rev Genet, 1996, 30: 465—506.
- [3] Lipinska B, Fayet O, Baird L, Georgopoulos C. Identification, characterization, and mapping of the *Escherichia coli* htrA gene, whose product is essential for bacterial growth only at elevated temperatures [J]. J Bacteriol, 1989, 171(3): 1574—1584.
- [4] Misra R, CastilloKeller M, Deng M. Overexpression of protease-deficient DegP (S210A) rescues the lethal phenotype of *Escherichia coli* OmpF assembly mutants in a degP background[J]. J Bacteriol, 2000, 182(17): 4882—4888.
- [5] CastilloKeller M, Misra R. Protease-deficient DegP suppresses lethal effects of a mutant OmpC protein by its capture[J]. J Bacteriol, 2003, 185(1): 148—154.
- [6] Isaac D D, Pinkner J S, Hultgren S J, Silhavy T J. The extracytoplasmic adaptor protein CpxP is degraded with substrate by DegP[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(49): 17775—17779.
- [7] Swamy K H, Chung C H, Goldberg A L. Isolation and characterization of protease do from *Escherichia coli*, a large serine protease containing multiple subunits [J]. Arch Biochem Biophys, 1983, 224(2): 543—554.
- [8] Lipinska B, Zylicz M, Georgopoulos C. The HtrA (DegP) protein, essential for *Escherichia coli* survival at high temperatures, is an endopeptidase[J]. J Bacteriol, 1990,

- 172(4); 1791—1797.
- [9] Spiess C, Beil A, Ehmann M. A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein[J]. *Cell*, 1999, 97(3): 339—347.
- [10] Kim K I, Park S C, Kang S H, Cheong G W, Chung C H. Selective degradation of unfolded proteins by the self-compartmentalizing HtrA protease, a periplasmic heat shock protein in *Escherichia coli*[J]. *J Mol Biol*, 1999, 294(5): 1363—1374.
- [11] Skorko-Glonek J, Kizewski K, Lipinska B, Bertoli E, Tanfani F. Comparison of the structure of wild-type HtrA heat shock protease and mutant HtrA proteins. A Fourier transform infrared spectroscopic study[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(19): 11140—11146.
- [12] Krojer T, Garrido-Franco M, Huber R, Ehmann M, Clausen T. Crystal structure of DegP (HtrA) reveals a new protease-chaperone machine[J]. *Nature*, 2002, 416(6879): 455—459.
- [13] Sassoon N, Arie J P, Betton J M. PDZ domains determine the native oligomeric structure of the DegP (HtrA) protease[J]. *Mol Microbiol*, 1999, 33(3): 583—589.
- [14] Jomaa A, Damjanovic D, Leong V, Ghirlando R, Iwanczyk J, Ortega J. The inner cavity of *Escherichia coli* DegP protein is not essential for molecular chaperone and proteolytic activity[J]. *J Bacteriol*, 2007, 189(3): 706—716.
- [15] Iwanczyk J, Damjanovic D, Kooistra J, et al. The role of the PDZ domains in *Escherichia coli* DegP Protein [J]. *J Bacteriol*, 2007, Feb 2; 17277057.
- [16] Wilken C, Kitzing K, Kurzbauer R, Ehmann M, Clausen T. Crystal structure of the DegS stress sensor: How a PDZ domain recognizes misfolded protein and activates a protease [J]. *Cell*, 2004, 117(4): 483—494.
- [17] Zeth K. Structural analysis of DegS, a stress sensor of the bacterial periplasm [J]. *FEBS Lett*, 2004, 569(1—3): 351—358.
- [18] Li W, Srinivasula S M, Chai J, Li P, Wu J W, Zhang Z, Alnemri E S, Shi Y. Structural insights into the pro-apoptotic function of mitochondrial serine protease HtrA2/Omi[J]. *Nat Struct Biol*, 2002, 9(6): 436—441.
- [19] Strauch K L, Johnson K, Beckwith J. Characterization of degP, a gene required for proteolysis in the cell envelope and essential for growth of *Escherichia coli* at high temperature[J]. *J Bacteriol*, 1989, 171(5): 2689—2696.
- [20] Frank J. Single-particle imaging of macromolecules by cryo-electron microscopy[J]. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2002, 31: 303—319.
- [21] Gabashvili I S, Agrawal R K, Spahn C M, Grassucci R A, Svergun D I, Frank J, Penczek P. Solution structure of the *E. coli* 70S ribosome at 11.5 Å resolution[J]. *Cell*, 2000, 100(5): 537—549.
- [22] Ludtke S J, Baldwin P R, Chiu W. EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions [J]. *J Struct Biol*, 1999, 128(1): 82—97.
- [23] Groll M, Bochtler M, Brandstetter H, Clausen T, Huber R. Molecular machines for protein degradation [J]. *ChemBiochem*, 2005, 6(2): 222—256.
- [24] Braig K, Otwinowski Z, Hegde R, et al. The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å [J]. *Nature*, 1994, 371(6498): 578—586.
- [25] Lowe J, Stock D, Jap B, et al. Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution[J]. *Science*, 1995, 268(5210): 533—539.

DegP forms dodecamers upon binding to unfolded α -lactalbumin

CHEN Guo, JIANG Jian-sen, SUI Sen-fang^{*}

(Department of Biological Sciences and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: *Escherichia coli* heat shock protein DegP, also known as HtrA and protease Do, was found to exhibit dual activities as a protease and a molecular chaperone. The activities of DegP are indispensable for cells to grow at elevated temperatures. Its crystal structure was revealed to be a hexamer formed through staggered association of two trimeric rings. In the present work, we demonstrated that the DegP hexamers convert to larger oligomers upon binding to the unfolded α -lactalbumin by gel filtration experiments. The negatively stained specimens of these oligomers were subjected to electron microscopy analysis and single particle reconstruction. The results revealed that they are cage-like dodecamers composed of 4 trimers in a tetrahedral symmetry. Referred to previous publications, we then suggest that they may represent the status of DegP in protease and chaperone activities and are thus functionally important.

Keywords: heat shock protein DegP; single particle technology; electron microscopy