

Summary

The bacterial cold shock proteins (CSP) are essential players in bacterial cold shock response [7, 56-59]. These small proteins (65 - 70 amino acids) bind single-stranded nucleic acids with micromolar to nanomolar K_D values. Although their biological role is not fully understood, there is good evidence that the CSP regulate the expression of certain cold stress response genes by transcription antitermination [74]. In addition, their ability to interact with single-stranded DNA and ssRNA in an apparently sequence-unspecific way, with K_D values in the micromolar range, and their ability to prevent the formation of nucleic-acid duplexes *in vitro*, led to the suggestion that the CSP act as RNA chaperones which prevent the formation of mispaired mRNA double strands [72]. Such aberrant RNA duplex formation is expected to preferentially occur in the cold. Its interference with mRNA translation may be the reason why the synthesis of most cellular proteins stops after a temperature downshift.

In order to gain further insight into the molecular principles of nucleic-acid binding by CSP, *Bs*-CspB from *Bacillus subtilis* and *Bc*-Csp from *Bacillus caldolyticus* were cocrystallized with hexathymidine (dT₆), and the complex structures were solved by X-ray diffraction techniques at resolutions of 1.78Å and 1.29Å, respectively. These are the first published crystal structures of CSP binding to nucleic acids. Despite some differences in arrangements of protein and ligand molecules in the crystals, caused by differences in the molecular packing, it was possible to define a common ligand-interaction surface, which contains seven nucleobase-binding subsites. In both complex structures the ligands adopt irregular extended single-stranded conformations. Their nucleobases are destacked with respect to each other and interact with protein groups through extensive stacking interactions and some polar contacts, while their sugarphosphate backbone is solvent exposed. The molecular composition of the interaction surface would allow the binding of uridine-ribonucleotides without providing additional interactions. In addition, binding studies of *Bs*-CspB and *Bc*-Csp were performed, which reveal similar binding preferences and demonstrate that both CSP preferentially bind to thymine-rich heptanucleotides. By combining positional binding preferences and structural data from both complexes, a model for the interaction of CSP with a heptanucleotide motif was created, which may provide further insight into transcription antitermination by CSP. Comparisons of the complex structures with ligand-free crystal structures indicate that the binding interface is already preformed in the absence of a ligand. The high degree of conservation of the binding interface in sequences of other CSP and the related *eukaryotic* Y-box proteins suggests that these proteins do not only have a common ancestor but also share a

common mode of ligand-binding and display similar binding preferences.

In addition, the structure of the *Bc*-Csp-dT₆ complex was further evaluated, because it is organized as a swapped dimer. A similar structural rearrangement has not been reported for any other structure of a CSP or other OB-fold member so far. The swap is enabled by a strictly localized change of the peptide plane linking Glu36-Gly37 in loop L₃₄, which causes the protein chain to relocate by an effective 180° rotation at this position. This rearrangement separates the two β-sheets, which form the β-barrel in closed monomeric CSP structures. In the crystal, dimers are formed by two domain-swapped protein chains which assemble in a head-to-tail fashion and hence restore the globular CSP structure. The globular units of the swapped dimer can be superimposed with monomeric CSP, giving root-mean-square deviations below 0.5 Å. Although so far trials to produce and isolate a CSP swapped dimer in solution have remained unsuccessful, the open state of the protein chain in the crystal structure may give insight into CSP folding and misfolding, as for *Ec*-CspA amyloid formation a similar partitioning of the protein chain has been reported [93].

In the last part of this study, effects contributing to CSP stabilization were analyzed using structures of two stabilized variants of *Bs*-CspB derived from *Proside in-vitro* selections [11]. These variants, whose structures were solved by X-ray crystallography at resolutions of 2.6 and 2.3 Å, feature three (M1R/E3K/K65I) and two (A46K/S48R) mutations, which increase their melting temperatures by 29.9 °C and 15.9 °C. Four stabilizing mutations strengthen non-local interactions between the two β-sheets. The mutation M1R, located at the N-terminus, is especially impressive: it provides five additional hydrogen bonds and a salt bridge connecting β-strand 1 to β-strands 4 and 5, and improves the molecular packing on the protein surface. Other examples of non-local stabilization involve compensations of unfavorable charge interactions by charge inversion, and through attenuation by providing opposite charges. The replacement of the partially buried Lys65 by isoleucine improves local interactions with surrounding hydrophobic groups from the protein core. Many residues which stabilize *Bs*-Csp are quite prevalent at analogous positions of other natural occurring CSP. Within species the number of stabilizing residues can vary for different CSP paralogs, whereas their ligand-binding interfaces are highly conserved. This suggests that different CSP paralogs differing in stability may function at different temperatures.

Zusammenfassung

Die bakteriellen Kälteschockproteine (CSP) sind essentielle Komponenten der bakteriellen Kälteschockantwort [7, 56-59]. Diese 65 - 70 Aminosäuren umfassenden Proteine binden an einzelsträngige Nukleinsäuren mit K_D Werten im micro- bis nanomolaren Bereich. Obwohl ihre biologische Funktion noch nicht vollständig verstanden ist, gibt es gute Hinweise darauf, daß CSP die Expression bestimmter Gene der Kälteschockantwort durch Antitermination der Transkription regulieren. Ihre Fähigkeit mit einzelsträngiger DNA und RNA auf offenbar sequenzspezifische Weise in Wechselwirkung zu treten und die Ausbildung von Nukleinsäureduplexen *in vitro* zu verhindern führte darüber hinaus zu der Vorstellung, daß die CSP RNA Chaperone sein könnten, welche das Entstehen von mRNA Duplexen durch Basenfehlpaarung bei niedrigen Temperaturen verhindern und daher für die Proteinbiosynthese unter diesen Bedingungen benötigt werden [72].

Um die Mechanismen der Nukleinsäurebindung auf molekularer Ebene zu untersuchen, wurden zwei Kälteschockproteine, *Bs-CspB* aus *Bacillus subtilis* und *Bc-Csp* aus *Bacillus caldolyticus*, mit Hexathymidin kokristallisiert und die Strukturen der Komplexe mit Hilfe der Röntgendiffraktion bei Auflösungen von 1.78 Å bzw. 1.29Å gelöst. Dies sind die ersten publizierten Kristallstrukturen von CSP in Komplex mit Nukleinsäuren. Trotz einiger Unterschiede in der Anordnung von Protein- und Ligandenmolekülen war es möglich, eine gemeinsame Ligandeninteraktionsfläche mit 7 Bindungsstellen für Nukleobasen zu definieren. In beiden Komplexen nehmen die Liganden ausladende und unregelmäßige einzelsträngige Konformationen ein. Die Nukleobasen sind voneinander entstapelt und treten mit dem Protein hauptsächlich durch Stapelwechselwirkungen und einige polare Kontakte in Wechselwirkung. Das Rückgrat der DNA ist dem Lösungsmittel zugewandt. Der molekulare Aufbau der Interaktionsfläche läßt auch die Bindung von Uridin-Ribonukleotiden zu, ohne dass es zu weiteren Wechselwirkungen kommen würde. Darüber hinaus wurde durch Bindungsstudien mit *Bs-CspB* und *Bc-Csp* nachgewiesen, daß beide Proteine auch in Lösung ähnliche Bindungspräferenzen aufweisen und bevorzugt an thyminreiche Heptanukleotide binden. Durch die Kombination struktureller Daten beider Komplexe mit den Daten über Bindungspräferenzen in Lösung gelang es, ein Modell zu konstruieren, das die Bindung von CSP an ein Heptanukleotid beschreibt und erklären könnte, wie CSP als Transkriptionsantiterminatoren fungieren. Vergleiche von CSP der Komplexstrukturen mit Kristallstrukturen von CSP ohne Liganden zeigen, daß die Ligandenbindungsstelle auch in Abwesenheit des Liganden vorliegt. Die starke Konservierung des Bindungsmotivs in Sequenzen anderer CSP und der eukaryotischen

Y-Box Proteine deutet darauf hin, daß all diese Proteine nicht nur von einen gemeinsamen Vorläufer abstammen, sondern auch ein gemeinsames Prinzip der Nukleinsäurebindung und ähnliche Bindungspräferenzen aufweisen.

Zusätzlich zur Nukleinsäurebindung wurde die Struktur des *Bc-Csp·dT₆* weitergehend untersucht, da sie als domänengetauschtes Dimer (swapped Dimer) organisiert ist. Eine ähnliche strukturelle Umlagerung wurde bisher noch bei keinem anderen Vertreter des OB Faltungstyps beschrieben. Der Austausch wird durch eine räumlich begrenzte Änderung des Proteinerückgrats in Loop L₃₄ ermöglicht, welche die Aminosäuren Glu36 und Gly37 miteinander verbindet. Dies führt zu einer effektiven Rotation der Proteinkette um 180°. Dadurch werden die beiden β -Faltblätter, die in geschlossenen, monomeren CSP Strukturen ein β -Faß bilden, voneinander getrennt. Im Kristall bilden zwei domänengetauschte Proteinketten ein Dimer, indem sie sich wechselseitig ergänzen. Dies stellt die globuläre CSP Struktur wieder her. Die globulären Einheiten des domänengetauschten Dimers sind Strukturen von monomeren CSP sehr ähnlich, die Summe der gemittelten Entfernungskvadrat zwischen äquivalenten Bereichen liegt unter 0.5 Å. Obwohl es bisher nicht gelang, ein domänengetauschtes Dimer eines CSP in Lösung zu isolieren, könnte der geöffnete Zustand der Peptidkette in der Kristallstruktur Einblicke in die Faltung und Fehlfaltung der CSP geben, da in der Entstehung von CSP Amyloiden eine ähnliche Untergliederung der Peptidkette beschrieben wurde [93].

Im letzten Teil dieser Arbeit werden Effekte untersucht, die zur Stabilisierung von CSP beitragen. Hierzu wurden zwei stabilisierte *Bs-CspB* Varianten verwendet, die Dreifachmutante M1R/E3K/K65I und die Doppelmutante A46K/S48R, die mit Hilfe der *Proside* Methode erzeugt wurden [11]. Die Auflösungen der Strukturen betragen 2.6 bzw. 2.3 Å. Vier der stabilisierenden Mutationen verstärken nicht-lokale Wechselwirkungen zwischen den beiden β -Faltblättern. Die M1R ermöglicht die Ausbildung von fünf weitere Wasserstoffbrückenbindungen und einer Salzbrücke und verbessert die Packung an der Proteinoberfläche. Weitere Beispiele umfassen den Ausgleich ungünstiger Ladungswechselwirkungen durch Ladungsinversion, oder Einbringen entgegengesetzt geladener Gruppen. Die meisten Mutationen verstärken Wechselwirkungen zwischen den β -Faltblättern. Der Austausch eines partiell vom Lösungsmittel abgeschirmten Lysins durch Isoleucin wirkt stabilisierend durch Verbesserung von lokalen Wechselwirkungen mit Gruppen des hydrophoben Proteinkerns. Viele der Aminosäuren, welche *Bs-CspB* stabilisieren, kommen an analogen Positionen anderer CSP vor. Innerhalb einer Spezies kann die Anzahl stabilisierender Reste in CSP Paralogen variieren, was darauf hindeuten könnte, dass verschiedene paraloge CSP unterschiedlicher Stabilität bei verschiedenen Temperaturen zum Einsatz kommen.

