**PRÁCTICA 1: BIP**

**1. ¿Qué estrategias moleculares aumentan la termoestabilidad?**

Los estudios comparativos entre proteínas mesófilas y termófilas (incluyendo *cold shock proteins*) muestran que las mutaciones estabilizantes suelen estar asociadas a:

* **Incremento de interacciones hidrofóbicas en el núcleo** → mutar a residuos más voluminosos (Ile, Leu, Val, Phe, Tyr, Trp) en posiciones internas compacta mejor el barrel β.
* **Puentes salinos adicionales (salt bridges)** → introducción de pares cargados opuestos (Lys/Arg–Asp/Glu) en superficies o en interfaces de láminas β.
* **Rigidez local en loops** → introducción de **Prolina** en bucles expuestos reduce entropía conformacional.
* **Redes de enlaces de hidrógeno optimizados** → mutaciones que favorecen cadenas laterales capaces de puentear (Asn, Gln, Thr).
* **Disulfuro** (menos común en Csps, pero teóricamente posible si hay geometría favorable).

**2. Caso concreto: Bs-CspB (PDB: 1CSP)**

Bs-CspB es una proteína mesófila con Tm ≈ 49 °C. Su homólogos termófilos (p.ej. en *Thermotoga maritima*) alcanzan Tm > 80 °C, y las comparaciones estructurales muestran varias diferencias:

* **Núcleo hidrofóbico más denso**:  
  En Bs-CspB hay posiciones con Ala/Ser en el core que en las Csps termófilas suelen ser Ile/Val/Leu. Mutaciones como **Ala→Val/Ile** o **Ser→Leu** en el núcleo pueden incrementar la estabilidad.
* **Puentes salinos adicionales**:  
  Ciertas Csps termófilas presentan pares Arg–Glu en la superficie que no existen en Bs-CspB. Introducir un **Asp/Glu cerca de una Lys/Arg** ya existente puede formar un puente salino adicional.
* **Prolinas en loops flexibles**:  
  En loops de Bs-CspB se encuentran Gln/Ser flexibles donde las versiones termófilas usan Pro. Ejemplo: mutar un residuo en un loop largo expuesto a **Prolina** estabiliza reduciendo entropía.
* **Aromáticos en posiciones estratégicas**:  
  Algunas termófilas refuerzan el núcleo con **Tyr/Phe** en lugar de residuo pequeño. Esto añade stacking y más interacciones de van der Waals.

**3. Ejemplos de mutaciones candidatas en 1CSP**

*(Hipotéticas, se deben validar con PyRosetta o ddg\_monomer, pero ilustran los principios):*

* **Ala34 → Val** (más packing en núcleo).
* **Ser16 → Leu** (hidrofobicidad interna).
* **Gly42 → Pro** (rigidez en loop).
* **Introduce Asp en posición cercana a Lys7** → posible nuevo puente salino.
* **Tyr sustituyendo a Phe en β-barrel** para reforzar stacking.

**4. Cómo se traduce en estabilidad**

Cada mutación contribuye entre 0.5–2 kcal/mol. Recordemos la correlación aproximada:

ΔTm(°C)≈7.1×ΔΔG(kcal/mol)ΔT\_m (°C) ≈ 7.1 × ΔΔG (kcal/mol)ΔTm​(°C)≈7.1×ΔΔG(kcal/mol)

Así, un diseño con ΔΔG ≈ –3 kcal/mol podría aumentar la Tm en ~20 °C.

En resumen: para convertir Bs-CspB (mesófila) en una variante más termófila se suelen introducir **mutaciones que aumenten el packing hidrofóbico, generen nuevos puentes salinos y rigidifiquen loops con Prolina**. En la práctica, combinaciones de 3–5 mutaciones bien colocadas pueden desplazar la Tm de ~49 °C a >65 °C.

 Robertson, A. D., & Murphy, K. P. (1997). Protein structure and the energetics of protein stability. *Chemical Reviews, 97*(5), 1251–1267. <https://doi.org/10.1021/cr960383c>

 Vieille, C., & Zeikus, G. J. (2001). Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews, 65*(1), 1–43. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.1.1-43.2001>

 Kumar, S., Tsai, C. J., & Nussinov, R. (2000). Factors enhancing protein thermostability. *Protein Engineering, 13*(3), 179–191. <https://doi.org/10.1093/protein/13.3.179>

 Mueller, U., Perl, D., Schmid, F. X., & Heinemann, U. (2000). Thermodynamic stabilization of the cold-shock protein CspB from *Bacillus subtilis* studied by mutational analysis. *Journal of Molecular Biology, 297*(4), 975–988. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3608>

 Perl, D., Mueller, U., Heinemann, U., & Schmid, F. X. (2000). Two exposed amino acid residues confer thermostability on a cold shock protein. *Nature Structural Biology, 7*(5), 380–383. <https://doi.org/10.1038/75154>

 Phadtare, S., & Inouye, M. (2004). Genome-wide transcriptional analysis of the cold shock response in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry, 279*(16), 16354–16360. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313724200>