



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**BASES ENERGÉTICAS DEL RECONOCIMIENTO MOLECULAR DE LA  
PROTEÍNA BOVINA UNIDORA DE ODORANTES**

**TESIS**  
**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**  
**DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**  
**HOMERO GÓMEZ VELASCO**

**DIRECTOR DE TESIS**  
**DR. ENRIQUE GARCÍA HERNÁNDEZ**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**COMITÉ TUTOR**  
**DR. DANIEL ALEJANDRO FERNÁNDEZ VELASCO**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DR. DIEGO GONZÁLEZ HALPHEN**  
**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**CIUDAD DE MÉXICO, SEPTIEMBRE DE 2020**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*A mi familia y amigos*

## Agradecimientos

La presente tesis fue realizada en el Departamento de Química de Biomacromoléculas del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Enrique García Hernández. Durante la realización de este trabajo, se contó con el apoyo económico de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) a través del proyecto PAPIIT IN205018, así como el Consejo Nacional de la Ciencia y la Tecnología (CONACyT), proyecto 235831. Se agradece el apoyo de las técnico-académicas Dra. Patricia Cano Sánchez, Q. Rocío Patiño Maya, M. C. Lucía del Carmen Márquez Alonso, M. C. Lucero Ríos Ruiz y Q. Eréndira García Ríos del Instituto de Química, UNAM. Homero Gómez Velasco recibió la beca de doctorado No. 290337, otorgada por CONACyT.



# Índice general

1	Resumen .....	3
2	Abstract.....	4
3	Introducción.....	5
3.1	Las lipocalinas.....	5
3.2	Función de las lipocalinas.....	7
3.3	Estado oligomérico de las lipocalinas.....	8
3.4	Aplicaciones de las lipocalinas .....	9
3.4.1	Marcadores moleculares de enfermedades.....	9
3.4.2	Anticalinas.....	9
3.4.3	Sistemas de filtración.....	10
3.4.4	Sensores .....	10
3.4.5	Transportadores de fármacos .....	10
3.5	Termodinámica de la interacción proteína-ligando.....	10
3.5.1	Estudios termodinámicos de la interacción de lipocalinas con ligandos hidrofóbicos.....	13
3.6	Antecedentes de la lipocalina bOBP.....	16
3.6.1	Estructura .....	16
3.6.2	Sitio de unión al ligando.....	18
3.6.3	Función .....	19
3.7	Planteamiento del problema.....	20
4	Hipótesis.....	21
5	Objetivo general.....	22
6	Objetivos particulares .....	22
7	Materiales y métodos .....	23
7.1	Materiales .....	23
7.2	Expresión y purificación de las proteínas recombinantes.....	23
7.3	Dispersión dinámica de luz (DLS) .....	23
7.4	Dicroísmo circular (CD) .....	24
7.5	Calorimetría diferencial de barrido (DSC) .....	24
7.6	Calorimetría de titulación isotérmica (ITC) .....	24
7.7	Simulaciones por dinámica molecular .....	25

8	Resultados.....	27
8.1	Estabilidad térmica del dímero silvestre bOBP y su mutante monomérica bOBP <sub>121G+</sub> .....	27
8.2	Caracterización energética de unión al ligando de bOBP y bOBP <sub>121G+</sub> .....	28
8.3	Análisis de parámetros de unión como una función de la longitud del ligando.	32
8.4	Simulación por dinámica molecular (MD) .....	33
8.5	Evaluación experimental del intercambio de moléculas de agua .....	36
8.6	Evaluación energética de las moléculas de agua .....	37
8.7	Intercambio de moléculas de agua a través de poros transitorios.....	39
9	Discusión .....	45
10	Conclusiones .....	49
11	REFERENCIAS.....	50
12	Anexo 1: Análisis estadístico .....	61

## Abreviaturas

$\text{\AA}^3$	Ångstroms cúbicos
$\beta\text{lg}$	$\beta$ -lactoglobulina
bOBP	Proteína de unión a odorantes bovina
bOBP <sub>121G+</sub>	bOBP con un residuo de Gly insertado en la posición 121
bOBP <sub>GCC</sub>	bOBP <sub>121G+</sub> con dos mutaciones en W64 y H116 con Cys
CD	Dicroísmo circular
$\Delta\text{ASA}$	Cambio de área accesible al disolvente
$\Delta H_a$	Cambio de entalpía de asociación
$\Delta S_a$	Cambio de entropía
$\Delta C_p$	Cambio de capacidad calorífica
$\Delta C_{p\text{CH}_2}$	$\Delta C_p$ por grupo metileno
$\Delta H_{\text{vH}}$	$\Delta H$ de van't Hoff
$\Delta H_{\text{cal}}$	$\Delta H$ calorimétrico
$\Delta H_{\text{CH}_2}$	$\Delta H$ por grupo metileno
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
DLS	Dispersión dinámica de luz
$E_{\text{elec}}$	Energía electrostática
$E_{\text{vdW}}$	Energía de van der Waals
$E_{\text{pot}}$	Energía potencial
$gl$	Grados de libertad
$H_0$	Hipótesis nula
$H_1$	Hipótesis alternativa
HEX	1-hexen-3-ol
ITC	Calorimetría de titulación isotérmica
$K_a$	Constante de unión
$k_{\text{on}}$	Constante cinética de asociación

$k_{\text{off}}$	Constante cinética de disociación
kDa	kilodaltons
$\mu$	Media aritmética de la población
$\mu\text{M}$	Micromolar
MD	Dinámica molecular
MM	Masa molecular
mM	Milimolar
$N_{\text{hb}}$	Número de puentes de hidrógeno
$N_{\text{w}}$	Número de moléculas de agua
ns	Nanosegundos
nm	Nanómetros
OCT	1-octen-3-ol
pH	Potencial de hidrógeno
RMSD	Desviación cuadrática media
RMSF	Fluctuación residual
RMN	Resonancia magnética nuclear
$R_{\text{H}}$	Radio hidrodinámico
s	Desviación estándar
SCR	Región estructuralmente conservada
$t$	$t$ de student
$t_{\text{calculado}}$	$t$ calculado
$T\Delta S_{\text{CH}_2}$	$T\Delta S$ por grupo metileno
$\bar{x}$	Media aritmética de la muestra

# 1 Resumen

Las lipocalinas son una familia de proteínas extracelulares distribuida ampliamente, normalmente involucradas en el transporte de pequeñas moléculas hidrofóbicas. Para profundizar nuestra comprensión sobre las bases moleculares que gobiernan el reconocimiento del ligando por esta familia ancestral de proteínas, las propiedades de unión de la proteína de unión a odorantes bovina (bOBP) y su mutante monomérica bOBP<sub>121G+</sub> se caracterizaron usando técnicas calorimétricas y de simulación de dinámica molecular. Los perfiles de desplegamiento térmico revelaron que las subunidades aisladas de bOBP se comportan como una unidad de plegamiento cooperativa. Además, bOBP y bOBP<sub>121G+</sub> presentan propiedades de unión similares, exhibiendo un efecto hidrofóbico no-clásico en el reconocimiento de ligandos. Las diferencias energéticas en la unión de bOBP a 1-hexen-3-ol y su ligando fisiológico 1-octen-3-ol fueron notablemente mayores a las observadas para la interacción de otras lipocalinas con ligandos congénicos. Simulaciones por dinámica molecular revelaron que la apertura recurrente de poros transitorios, ocurriendo en la escala temporal de nanosegundos, permite un intercambio abundante de moléculas de agua entre el interior de la proteína y el seno acuoso. Este comportamiento contrasta con otras lipocalinas, cuyas cavidades de unión libres de ligando carecen de moléculas de agua. Además, las simulaciones indicaron que las moléculas de agua que se alojan dentro de la proteína solvatan la cavidad de unión ineficientemente, formando menos puentes de hidrógeno, y con menor densidad y mayor energía potencial que las moléculas de agua en el seno acuoso. Tras la ocupación del ligando, las moléculas de agua se desplazan de la cavidad de unión en una cantidad que depende del tamaño del ligando. En conjunto, los resultados obtenidos por calorimetría y simulación por dinámica molecular son consistentes con una contribución significativa de la desolvatación de la cavidad a la interacción dirigida entálpicamente de bOBP con sus ligandos hidrofóbicos.

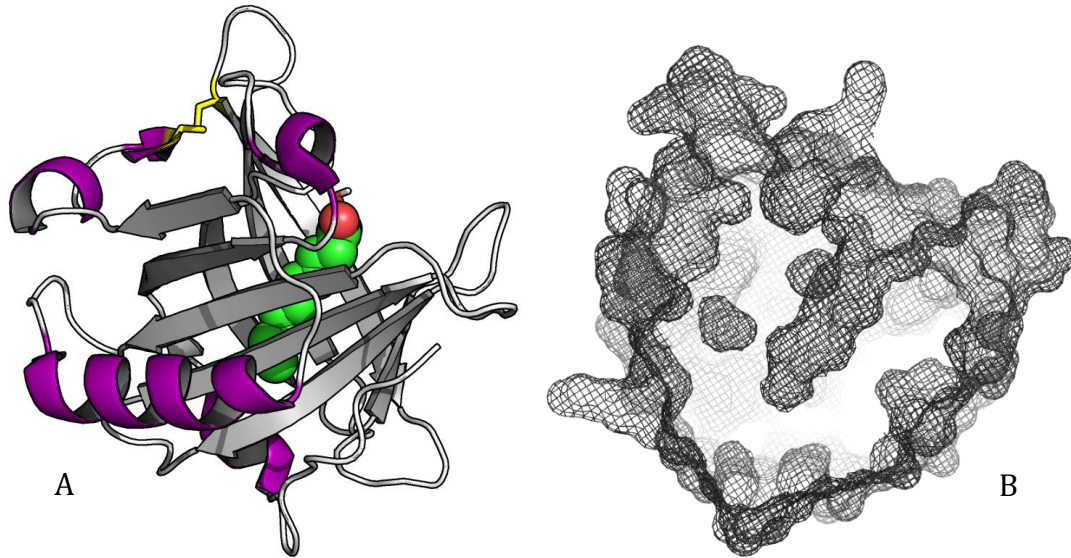
## 2 Abstract

Lipocalins are a widely distributed family of extracellular proteins typically involved in the transport of small hydrophobic molecules. To gain new insights into the molecular basis that governs ligand recognition by this ancient protein family, the binding properties of the domain-swapped dimer bovine odorant binding protein (bOBP) and its monomeric mutant bOBP121G+ were characterized using calorimetric techniques and molecular dynamics simulations. Thermal unfolding profiles revealed that the isolated bOBP subunits behave as a cooperative folding unit. In addition, bOBP and bOBP121G+ exhibited similar ligand binding properties, characterized by a non-classical hydrophobic effect signature. The energetic differences in the binding of bOBP to 1-hexen-3-ol and the physiological ligand 1-octen-3-ol were strikingly larger than those observed for the interaction of other lipocalins with congeneric ligands. MD simulations revealed that the recurrent opening of transient pores in the submicrosecond timescale allows a profuse exchange of water molecules between the protein interior and the surrounding solvent. This picture contrasts with other lipocalins whose ligand-free binding cavities are devoid of solvent molecules. Furthermore, the simulations indicated that internal water molecules solvate the protein cavity suboptimally, forming fewer hydrogen bonds and having lower density and higher potential energy than bulk water molecules. Upon ligand occupation, water molecules were displaced from the binding cavity in an amount that depended on the ligand size. Taken together, calorimetric and MD-simulation results are consistent with a significant contribution of cavity desolvation to the enthalpically-driven interaction of bOBP with its hydrophobic ligands.

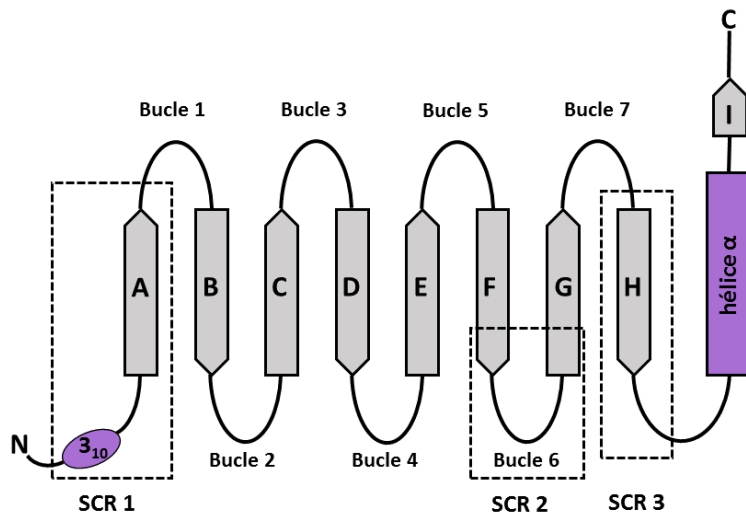
## 3 Introducción

### 3.1 Las lipocalinas

Las lipocalinas son una extensa familia de proteínas pequeñas con una masa molecular promedio de 20 kDa. Estas proteínas se encuentran distribuidas en animales vertebrados e invertebrados, plantas, hongos y bacterias [1,2]. A pesar de la baja identidad de secuencia (<20%), las lipocalinas comparten un motivo estructural altamente conservado que consta de un solo dominio formado por un barril de ocho hebras  $\beta$  antiparalelas, el cual está típicamente flanqueado por una o más hélices  $\alpha$  y una hebra  $\beta$  en el extremo carboxilo terminal [3] (**Figuras 1 y 2**). En el centro del barril  $\beta$  aparece una cavidad grande con apariencia de un cáliz. En las lipocalinas, esta cavidad funciona como el sitio principal de unión para ligandos, y al ser altamente hidrofóbica, tiene la habilidad de transportar moléculas de pobre hidrosolubilidad. Se han identificado tres regiones de secuencia primaria conservadas, llamadas regiones estructuralmente conservadas (SCR), cada una con un motivo de secuencia específico, las cuales se han propuestos como requisito para que una proteína se considere como una lipocalina [4] (**Figura 2**). El motivo de secuencia SCR1 se define por los residuos G-x<sub>1</sub>-W-x<sub>2</sub> (siendo x<sub>2</sub> usualmente Y/F/W), y se encuentra localizado en la primera hebra  $\beta$  (hebra A). El motivo de secuencia T-D/N-Y-x-x-Y corresponde a SCR2 y se encuentra ubicado en el bucle 6, conectando las hebras F y G. Finalmente, el motivo SCR3 consta de un solo residuo cargado (R/K) en la hebra  $\beta$  H. Siguiendo la propuesta de Flower [5], las lipocalinas se dividen en dos subfamilias. La primera subfamilia, conocida como lipocalinas kernel, incluye a las proteínas que conservan los tres motivos; mientras que la segunda subfamilia, llamada 'lipocalinas outlier', engloban a las moléculas con solo uno o dos SCRs.



**Figura 1.** Representación esquemática de la estructura típica de una lipocalina. Se usa como ejemplo la estructura cristalográfica de la  $\beta$ -lactoglobulina bovina. **A)** Estructura con ligando (PDB 3nq3), donde se muestra el sitio de unión ocupado por el ligando ácido cáprico (representado con esferas de color verde), y una molécula de agua coordinada con el grupo polar del ligando que se encuentra localizado en la entrada del cáliz. Las ocho hebras  $\beta$  antiparalelas conforman el barril  $\beta$ , cuyo interior funciona como sitio de unión de ligandos. En la mayoría de lipocalinas un puente disulfuro (en barras color amarillo) mantiene el extremo carboxilo terminal en contacto con el barril  $\beta$ , proporcionando a la lipocalina una forma compacta y globular. **B)** Superficie sin ligando de la proteína  $\beta$ lg (PDB 3np0) representada en malla negra, donde se observa el sitio de unión vacío y accesible al disolvente.



**Figura 2.** Esquema bidimensional de la estructura secundaria de una lipocalina. Visión ortogonal al eje axial del barril desenrollado de una lipocalina. Típicamente, las lipocalinas presentan una hélice  $3_{10}$  y una hélice  $\alpha$  en los extremos amino y carboxilo terminal, respectivamente. También presentan siete bucles que conectan las ocho hebras  $\beta$ ; estas hebras conforman el barril  $\beta$  y están nombradas por las primeras ocho letras del abecedario. Las hebras  $\beta$ , hélices y giros y estructura desordenada se presentan en color gris, violeta y negro, respectivamente. Las regiones estructuralmente conservadas (SCR) están indicadas por rectángulos de línea punteada.



## 3.2 Función de las lipocalinas

Las lipocalinas se caracterizan por un reconocimiento molecular promiscuo de ligandos. Tienen la habilidad de unir pequeñas moléculas, principalmente moléculas hidrofóbicas, aunque también interactúan con receptores de superficie celular específicos [3]. Se han descubierto una gran variedad de funciones para las lipocalinas. Algunas de ellas tienen la función de transportar vitaminas muy poco hidrosolubles. En este grupo se encuentra la proteína de unión a retinol (RBP), la cual se sintetiza en el hígado, y se encarga de transportar retinol a través del sistema circulatorio [3]. Otras lipocalinas son transportadoras de feromonas, como la proteína urinaria mayor de ratón (mMUP), la cual se produce en el hígado de los roedores, y actúa como transportador de feromonas como 2-(s-butil)tiazolina o 2,3-deshidroexobrevicomina. Los complejos de mMUP se excretan en la orina de roedores machos, provocando varias respuestas sexuales en las hembras, incluyendo la aceleración en el comienzo de la pubertad. Las lipocalinas globulina  $\alpha_{2u}$  y afrodisina tienen funciones similares a mMUP [3].

Las lipocalinas denominadas proteínas de unión a odorantes (OBP) están involucradas en el sistema olfativo. Estas lipocalinas se sintetizan en las glándulas nasales laterales y se secretan en la mucosa nasal. Se encuentran en vertebrados, y representan el 1% de la proteína total de la mucosa nasal. Las OBP capturan moléculas odorantes hidrofóbicas dispersas en el ambiente y las transportan a los receptores olfativos, los cuales se encuentran en el epitelio olfativo de la nariz [3,6]. Algunos animales presentan más de un tipo de OBP, como es el caso de la rata, la cual tiene tres OBP [7,8].

Algunas lipocalinas actúan en la coloración de invertebrados. Tal es el caso de la proteína de unión a biliverdina (BBP), la cual forma un complejo con el pigmento biliverdina IX $\gamma$ , contribuyendo a la coloración en la epidermis o espacio interlaminar de las alas de la mariposa *Pieris brassicae* [3,9]. Otro ejemplo es la crustacianina  $\alpha$ , la cual forma complejo con un carotenoide responsable de la coloración azul del caparazón de la langosta [3,10].

También existen lipocalinas que son enzimas, como es el caso de la prostaglandina D sintasa (PGDS), la cual cataliza la isomerización de la prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) a prostaglandina D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>). Esta lipocalina se produce en el cerebro y se encuentra distribuida a través del sistema nervioso central [3,11]. Otras lipocalinas, como la glicoproteína ácida  $\alpha_1$  (AGP), la lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL), la proteína de embarazo 14 (PP14) y la microglobulina- $\alpha_1$  (A1M), están involucradas en la inmuno-regulación [12].

### 3.3 Estado oligomérico de las lipocalinas

La asociación no covalente de proteínas es muy común en la naturaleza, y está mediada por una red de enlaces débiles formados por interacciones electrostáticas y/o hidrofóbicas. Estas interacciones pueden ser cruciales para el funcionamiento y regulación de las formas activas de diversas clases de proteína, tal como enzimas y proteínas transportadoras [13]. El estado oligomérico de las lipocalinas es muy diverso. Podemos encontrar lipocalinas que no forman oligómeros, o lipocalinas que forman dímeros, heterodímeros, tetrámeros, y/o octámeros (**Tabla 1**) [3,14–16]. Algunas de ellas pueden formar más de un estado oligomérico. Un ejemplo es la  $\beta$ -lactoglobulina bovina ( $\beta$ lg), la cual puede formar monómeros, dímeros y octámeros funcionales [16]. A pesar del número creciente de lipocalinas reportadas que oligomerizan, el papel que juegan los contactos intercatenarios en la capacidad de unión y la regulación de la función de estas proteínas aún se desconoce.

**Tabla 1.** Estado oligomérico de algunas lipocalinas

Nombre	Abreviación	Estado oligomérico <sup>a</sup>	Ref.	
Proteína de unión a retinol	RBP	M, H	[17]	
Proteína de unión a ácido retinoico	RABP	M		
Globulina $\alpha_{2u}$	A2U o $\alpha$ G	D		
Proteína urinaria mayor	MUP	D		
Proteína de unión a bilina	BBP	T		
Crustacianina $\alpha$	---	OH		
Proteína de embarazo 14	PP14	H		
$\beta$ -Lactoglobulina bovina	$\beta$ lg	M, D, O		
Microglobulina $\alpha_1$	A1M	M, H		
Factor de complemento 8 $\gamma$	C8 $\gamma$	H		
Apolipoproteína D	ApoD	M, H		
Lazarillo	LAZ	M		
Prostaglandina D sintasa	PGDS	M		
Lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos	NGAL	M, D, H		
Proteína del plexo coroideo	---	M		
Afrodísina	---	M		
Proteína de la glándula von Ebner	VEGP	D		
Glicoproteína ácida $\alpha_1$	AGP	M		
Glicodelina	GLY	D		[14]
Lipocalina lagrimal	Tlc	M, D		
Proteína de unión a odorantes	OBP	M, D	[14][17]	
Proteína de unión a odorantes bovina	bOBP	D	[18]	
$\beta$ -lactoglobulina de cabra	GLG	M, D	[19]	

<sup>a</sup> M: monómero; D: dímero; H: heterodímero, O: octámero, OH: heterooctámero compuesto por dos subunidades diferentes.

## 3.4 Aplicaciones de las lipocalinas

### 3.4.1 Marcadores moleculares de enfermedades

Las lipocalinas se han utilizado como marcadores bioquímicos de diferentes enfermedades, con un alto grado de precisión. La forma libre de la microglobulina  $\alpha_1$  (A1M) se elimina por filtración glomerular en los riñones. La proteína filtrada normalmente se reabsorbe y degradada en los túbulos renales. En un paciente sano, la concentración de A1M en la orina es muy baja, pero cuando existe un daño en los túbulos renales su concentración se incrementa considerablemente. La glicoproteína ácida  $\alpha_1$  es una proteína glicosilada, producida en el hígado. En pacientes con procesos inflamatorios, enfermedades vasculares o diabetes, la concentración en plasma de esta proteína se incrementa. La apolipoproteína D se produce en la próstata, y se ha reportado que su elevada concentración está asociada con cáncer de próstata avanzado, cáncer de pecho y ginecomastia. Un elevado incremento en la concentración de RBP indica que existe un daño agudo en el hígado. Otro valioso marcador es la lipocalina PGDS. En pacientes con tumores cerebrales, la concentración de PGDS decrece casi un 50% en comparación con una persona sana. NGAL es una lipocalina que muestra un incremento en suero cuando existe una infección viral o bacteriana [20,21].

### 3.4.2 Anticalinas

A pesar de la variabilidad de secuencia y diversa especificidad, la conformación del barril  $\beta$  está altamente conservada en todas las lipocalinas. En contraste, las regiones de los bucles alrededor del sitio de unión muestran variación en su longitud, secuencia y conformación. Esta propiedad es análoga al modo en el cual los anticuerpos presentan seis bucles hipervariables en el ápice de la proteína. No obstante, comparado con los anticuerpos, las lipocalinas exhiben diversas ventajas biotecnológicas porque son más pequeñas en tamaño, poseen una alta estabilidad estructural, están compuestas de una sola cadena polipeptídica y muestran un grupo más simple de cuatro bucles hipervariables que pueden manipularse más fácilmente a nivel genético. Aprovechando estas ventajas, se ha utilizado evolución dirigida para generar lipocalinas artificiales, con capacidad para unir con gran afinidad pequeñas moléculas farmacológicas, otras proteínas, e incluso antígenos. A estas proteínas se les ha denominado anticalinas [22,23].

### 3.4.3 Sistemas de filtración

Una de las aplicaciones de las lipocalinas OPB es su uso en matrices de filtros de agua para eliminar contaminantes ambientales, como es el caso del herbicida triazina (uno de los herbicidas más comúnmente usados en el mundo), el cual puede causar disrupción endocrina en seres humanos [24].

### 3.4.4 Sensores

Otra aplicación de las OPB es su uso en biosensores SAW (surface acoustic wave) para la detección de moléculas odorantes en la industria de alimentos [25].

### 3.4.5 Transportadores de fármacos

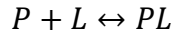
La b $\beta$ lg (**Figura 1**) es la principal proteína en el suero de la leche de vaca, representando alrededor del 10% de la proteína total de la leche. Con una masa molecular aproximada de 18 kDa, es una proteína globular con dos puentes disulfuro y un grupo tiol libre. La proteína b $\beta$ lg es comestible y se solubiliza fácilmente, siendo un buen emulsificante debido a su naturaleza anfifílica [26]. Gracias a su estabilidad, abundante disponibilidad y afinidad por diferentes ligandos hidrofóbicos, se ha utilizado para transportar diferentes compuestos, como retinol, colesterol, vitamina D, ácidos grasos, e incluso compuestos anticancerígenos como curcumina, complejos de metales pesados y nutracéuticos [27].

## 3.5 Termodinámica de la interacción proteína-ligando

La asociación no covalente entre dos macromoléculas está dada por la contribución de interacciones moleculares específicas. La naturaleza y magnitud de las fuerzas que gobiernan la formación de estos complejos determinan la termodinámica de la interacción. El punto de partida de la mayoría de los estudios termodinámicos de asociación entre proteínas y sus ligandos es la determinación experimental de la constante de unión ( $K_a$ ). De ahí, el cambio en la energía libre de Gibbs ( $\Delta G_a$ ) del sistema de estudio, a una temperatura dada, se puede evaluar usando la relación termodinámica siguiente:

$$\Delta G = -RT \ln K_a$$

donde  $R$  es la constante universal de los gases ( $1.987 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ) y  $T$  es la temperatura en grados Kelvin. En una reacción reversible donde interactúa una proteína ( $P$ ) con un ligando ( $L$ ) para formar un complejo ( $PL$ )



$K_a$  se representa como el cociente de la concentración del complejo dividido por el producto de las concentraciones de la proteína y el ligando libres,

$$K_a = \frac{[PL]}{[P][L]}$$

y es inversamente proporcional a la constante de disociación ( $K_d$ ):

$$K_d = \frac{[P][L]}{[PL]}$$

Como cualquier otro proceso espontáneo, la asociación ocurre sólo cuando el  $\Delta G$  de unión es negativo, también llamado proceso exergónico. El proceso opuesto, donde  $\Delta G$  es positivo, se denomina endergónico.

Para un estudio termodinámico detallado, es necesario examinar las contribuciones de el cambio de entalpía ( $\Delta H_a$ ) y de entropía ( $\Delta S_a$ ) del sistema, así como la dependencia térmica de estas funciones de estado. Midiendo experimentalmente  $\Delta H_a$  y  $K_a$ , es posible cuantificar  $\Delta S_a$  por medio de:

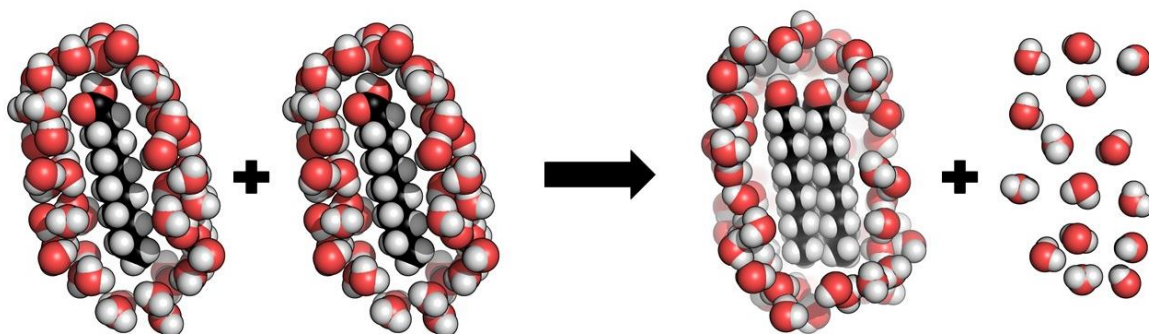
$$\Delta G_a = \Delta H_a - T\Delta S_a$$

Esto es importante ya que dos interacciones con estructura y afinidad similares pueden tener diferentes componentes entálpicos y entrópicos. Entendiendo estas diferencias en las contribuciones energéticas, y relacionándolas con la estructura y otros factores como la hidratación, se puede alcanzar una comprensión detallada de la interacción proteína-ligando.

El cambio en la entropía o la entalpía como función de la temperatura está dictado por el cambio en la capacidad calorífica a presión constante ( $\Delta C_p$ ). El agua de solvatación y el agua del seno del disolvente tienen diferentes comportamientos y propiedades, lo que produce un cambio en la capacidad calorífica debido a la liberación o captura de moléculas de agua cuando se forma el complejo. Por tanto, existe una fuerte correlación entre  $\Delta C_p$  y los cambios en el área superficial expuesta al disolvente ( $\Delta ASA$ ), permitiendo relacionar directamente la información estructural con los parámetros termodinámicos [28]. La solvatación o desolvatación de la proteína y el ligando, al momento de formarse el complejo, puede generar una contribución positiva o negativa en el  $\Delta C_p$ , dependiendo si el área superficial expuesta al disolvente es polar o apolar [29].

El reconocimiento del ligando por proteínas receptoras es una característica crucial para la mayoría de las funciones biológicas. La estabilización de unión implica el balance de diferentes interacciones intermoleculares débiles, tanto polares (puentes salinos, puente de hidrógeno) como no polares (van der Waals, apilamientos de anillos aromáticos), así como los cambios en los grados de libertad del disolvente y

de conformación de los solutos. En el caso de los ligandos no polares, uno de los principales determinantes de la interacción es el efecto hidrofóbico, el cual nace de la perturbación de la estructura del agua ejercida por un soluto hidrofóbico. Las moléculas de agua solvatantes se organizan alrededor de la molécula hidrofóbica, presentando por tanto una movilidad disminuida. Tal efecto puede ser minimizado si dos o más solutos hidrofóbicos se agregan para reducir el área superficial expuesta al disolvente, lo cual reduce el número de moléculas de agua ordenadas (**Figura 3**), generando por tanto una contribución entrópica favorable [30]. Clásicamente, este efecto se ha invocado para explicar la interacción de ligandos hidrofóbicos con sitios apolares de proteínas receptoras [31–33].



**Figura 3.** Efecto hidrofóbico clásico. La agrupación de los lípidos reduce el número de moléculas de agua ordenadas alrededor de la superficie hidrofóbica, produciendo una contribución entrópica favorable.

No obstante, se ha reportado para un número creciente de proteínas y otras entidades químicas que la contribución determinante en el reconocimiento de ligandos hidrofóbicos es una disminución en la entalpía [34–37], mientras que la entropía tiene un aporte marginal o incluso desfavorable a la interacción. Tal unión dirigida entálpicamente, llamada “efecto hidrofóbico no clásico”, se ha relacionado a una hidratación anómala del sitio de unión del receptor previo a la interacción con el ligando [34,38–40]. En la formación de un complejo proteína-ligando, las moléculas de agua se desplazan o acoplan a la interfaz de interacción o a la cavidad de unión. Esta reorganización de las capas de solvatación de los solutos puede afectar de forma dramática a la firma termodinámica de unión. Las estructuras de las moléculas de agua que rodean estas superficies son diferentes para cada tipo de superficie. La liberación de moléculas de agua de una superficie hidrofóbica plana o convexa es, generalmente, entrópicamente favorable, mientras que la liberación de moléculas de agua de una superficie hidrofóbica cóncava es, por lo menos en algunos casos, entálpicamente favorable [29].

### 3.5.1 Estudios termodinámicos de la interacción de lipocalinas con ligandos hidrofóbicos

Se ha reportado la termodinámica de unión a ligando de numerosos miembros de la familia de las lipocalinas [1], algunas de ellas se han estudiado exhaustivamente en este aspecto [40–43]. Sin embargo, la elucidación de los factores determinantes de la selectividad, los mecanismos de unión, y la energética de reconocimiento del ligando por parte de las lipocalinas sigue siendo un reto importante para la biofísica moderna. Por ejemplo, la función de las moléculas de agua ocultas en la cavidad de unión podría ser crucial en la cinética y termodinámica de unión del ligando, a pesar de esto, la elucidación de la contribución de estas moléculas de agua aún se desconoce y se ha estudiado en solo unas pocas lipocalinas [8,43–45]. En la **Tabla 2** se presenta una compilación de datos reportados en la literatura para la interacción de lipocalinas con ligandos hidrofóbicos. Como se puede observar, existe un comportamiento variado en cuanto a las contribuciones a la estabilidad de los complejos de las diferentes lipocalinas. mMUP isoforma I (mMUP-I) y dos variantes de OBP de rata (rOBP1 y rOBP3) muestran consistentemente un efecto hidrofóbico no clásico, independientemente del ligando que unan. En cambio, la  $\beta$ lg de leche de cabra (GLG) exhibe un efecto hidrofóbico clásico en la interacción con los dos ligandos estudiados. Mientras que la  $\beta$ lg, dependiendo del ligando, de la isoforma, pero también de las condiciones experimentales, exhibe interacciones de efecto hidrofóbico clásico, no clásico, e incluso con aportes de entropía y entalpía de tamaño comparable.

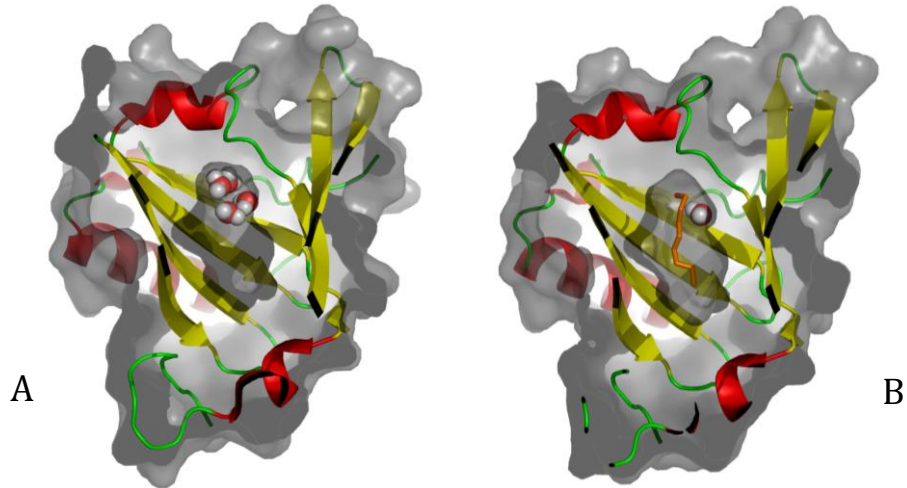
**Tabla 2.** Firmas termodinámicas de interacción lipocalina-ligando determinadas por ITC

Lipocalina	Ligando	Temperatura (°C)	pH	$\Delta H_a$ (kcal/mol)	$T\Delta S$ (kcal/mol)	$\Delta G$ (kcal/mol)	Ref.
$\beta$ lg A	dodecil sulfato de sodio	25	7.5	-0.60	7.47	-8.08	[46]
	ácido láurico	25	7.5	2.54	9.89	-7.35	
	cloruro de dodecil trimetil amonio	25	7.5	-0.39	6.09	-6.48	
$\beta$ lg B	dodecil sulfato de sodio	25	7.5	-2.72	5.19	-7.92	[46]
	ácido láurico	25	7.5	-0.81	6.22	-7.04	
	cloruro de dodecil trimetil amonio	25	7.5	-1.38	5.09	-6.46	
	tetracaína	25	7.5	4.76	8.77	-4.02	[47]
	pramocaína	25	7.5	-1.98	2.72	-4.73	[48]
	ácido láurico	25	7.5	-5.54	1.60	-7.14	
	ácido mirístico	25	7.5	-4.47	3.55	-8.00	
	ácido palmítico	25	7.5	-2.76	5.84	-8.61	
	[49]	ácido dodecanoico	25	7.5	-5.54	1.60	-7.14
		ácido tridecanoico	25	7.5	-4.39	4.77	-9.16
		ácido tetradecanoico	25	7.5	-4.48	3.55	-8.01
		ácido pentadecanoico	25	7.5	-8.86	0.06	-8.91
		ácido hexadecanoico	25	7.5	-2.76	5.85	-8.61
		ácido heptadecanoico	25	7.5	-13.19	-4.48	-8.71
ácido nonadecanoico		25	7.5	-11.71	-3.44	-8.27	
GLG	tetracaína	25	7.5	7.79	11.42	-3.66	[47]
	pramocaína	25	7.5	1.12	7.00	-5.88	

MUP-I	3-isopropil- 2-metoxipirazinas	35	7.4	-10.65	-2.55	-8.10	[50]
	3-isobutil-2-metoxi-pirazina	35	7.4	-11.45	-2.24	-9.20	
	1-pentanol	27	7.4	-9.80	-4.28	-5.52	[51]
	1-hexanol	27	7.4	-11.38	-4.61	-6.76	
	1-heptanol	27	7.4	-12.76	-5.00	-7.77	
	1-octanol	27	7.4	-13.86	-5.35	-8.51	
	1-nonanol	27	7.4	-15.20	-5.93	-9.27	
rOBP1	<i>n</i> -butil acetato	21	7.4	-7.12	1.00	-8.15	[25]
	<i>iso</i> -butil acetato	21	7.4	-7.48	0.57	-8.03	
	<i>s</i> -butil acetato	21	7.4	-6.78	1.67	-8.38	
	<i>t</i> -butil acetato	21	7.4	-7.28	1.05	-8.36	
rOBP3	$\gamma$ -heptalactona	25	7.4	-16.84	-9.79	-7.06	[8]
	$\gamma$ -octalactona	25	7.4	-15.42	-7.68	-7.74	
	$\gamma$ -nonalactona	25	7.4	-12.80	-5.06	-7.74	
	$\gamma$ -decalactona	25	7.4	-10.70	-2.90	-7.80	
	$\gamma$ -undecalactona	25	7.4	-7.00	0.17	-7.17	
	3-isobutil-2-metoxi-pirazina	25	7.5	-13.41	0.41	-13.81	[52]
	2-metil-1,4-naftoquinona	25	7.5	-15.77	0.57	-16.35	
	2-Isobutil tiazol	30	7.5	-15.58	-6.91	-8.67	[53]
	4,5-Dimetil tiazol	30	7.5	-12.61	-4.82	-7.79	

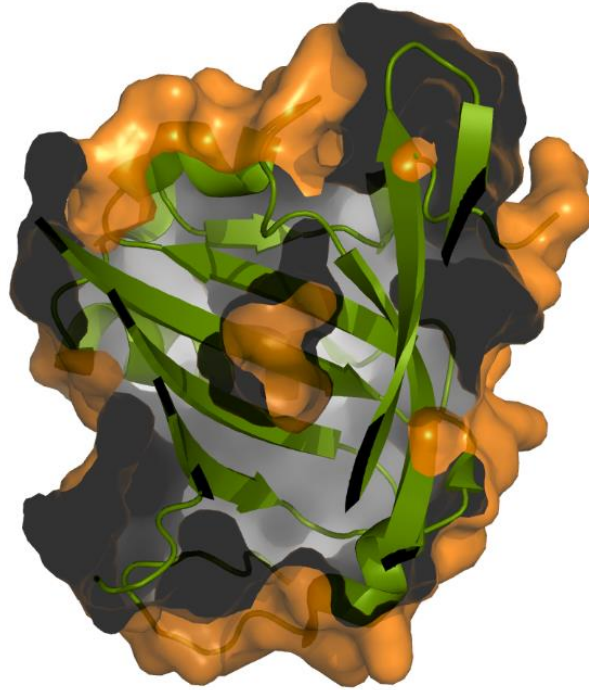
Respecto a las bases energéticas del reconocimiento del ligando, mMUP-I es hasta ahora la lipocalina estudiada a mayor profundidad (**Figura 4**). Mediante una estrategia de aproximación múltiple incluyendo calorimetría de titulación isotérmica (ITC), espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), cristalografía de rayos X, y simulación por dinámica molecular (MD), el grupo de Homans desentrañó las contribuciones energéticas fundamentales que explican el efecto hidrofóbico no clásico exhibido por esta lipocalina [40]. Los autores aportaron evidencia de que la cavidad de unión de apo mMUP-I está sub-óptimamente hidratada. Por consiguiente, la desolvatación de la proteína produce una ganancia entrópica disminuida con respecto a la desolvatación de una superficie proteica plenamente hidratada. El defecto de moléculas de agua solvatantes en la cavidad de unión implica una penalización entálpica significativamente reducida. Este estado pre-deshidratado, junto con un cambio entrópico conformacional marginal de la proteína (debido al incremento compensado y restricciones en la movilidad de diferentes residuos distribuidos a lo largo de todo el barril  $\beta$ ) y la completa desolvatación del ligando, permitió explicar cuantitativamente la pequeña entropía global de unión desfavorable [54]. A su vez, las interacciones de van der Waals favorables establecidas entre la proteína y el ligando exceden el costo de desolvatar el ligando [50,51,55], dando origen a una interacción entálpicamente favorecida.





**Figura 4.** Sitio de unión de mMUP-I. **A)** Estructura sin ligando (PDB 2ozq), donde se observa el sitio de unión parcialmente ocupado con cuatro moléculas de agua. **B)** Estructura con ligando (PDB 1znh), donde se muestra su sitio de unión ocupado por el ligando octanol (representado con barras de color naranja), y una molécula de agua cercana al grupo polar del ligando, ambos completamente enterrados en la cavidad de la proteína. La estructura secundaria está representada en listones. Las hebras  $\beta$ , hélices y giros están representados en color amarillo, rojo y verde, respectivamente. La superficie molecular está en color gris. Las moléculas de agua están representadas por esferas.

En un estudio reciente se caracterizó la unión de rOBP3 a una serie de  $\gamma$ -lactonas alifáticas (**Figura 5**) [8]. Para todos los ligandos evaluados, la unión resultó entálpicamente dirigida. Entalpías y entropías de unión significativamente más negativas se observaron para mutantes de rOBP3 en las cuales cada uno de los residuos de Phe que recubren el interior de la cavidad de unión se sustituyó por Ala. Los autores concluyeron que el remplazo del residuo voluminoso por uno pequeño aumentó el volumen de la cavidad de unión, provocando presumiblemente la incorporación de un número adicional de moléculas de agua dentro de la cavidad apo, lo cual a su vez produjo una entalpía más favorable en la interacción con el ligando. Sin embargo, en ese estudio no se realizó una caracterización de la hidratación interna de la cavidad de unión de rOBP3.

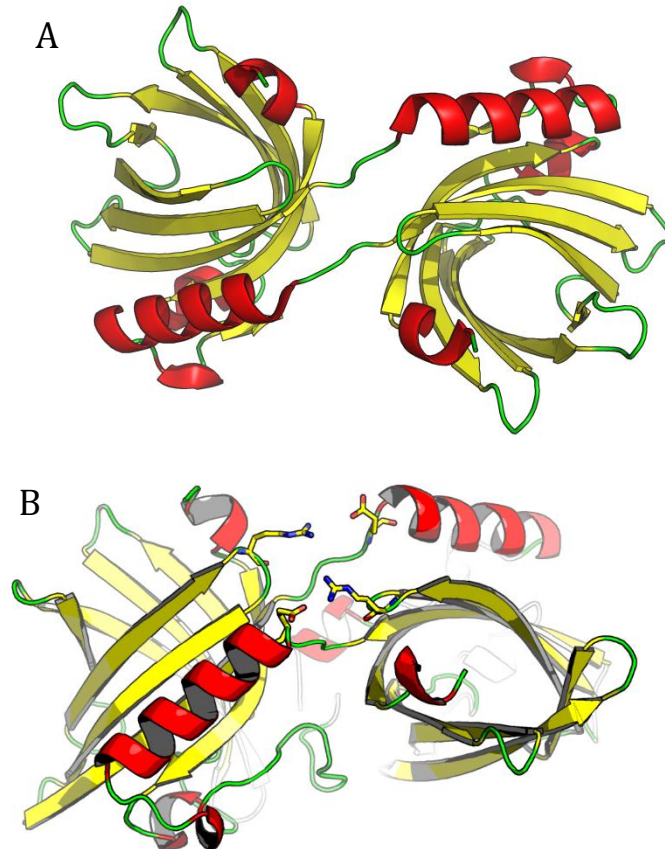


**Figura 5.** Forma apo de la proteína rOBP3 (PDB 3ZQ3). La estructura secundaria y la superficie de la proteína se muestran en color verde y naranja, respectivamente. En el centro de la imagen se observa el sitio de unión de la proteína completamente oculto a la superficie. No se ha resuelto experimentalmente la estructura de rOBP3 en complejo con algún ligando.

## 3.6 Antecedentes de la lipocalina bOBP

### 3.6.1 Estructura

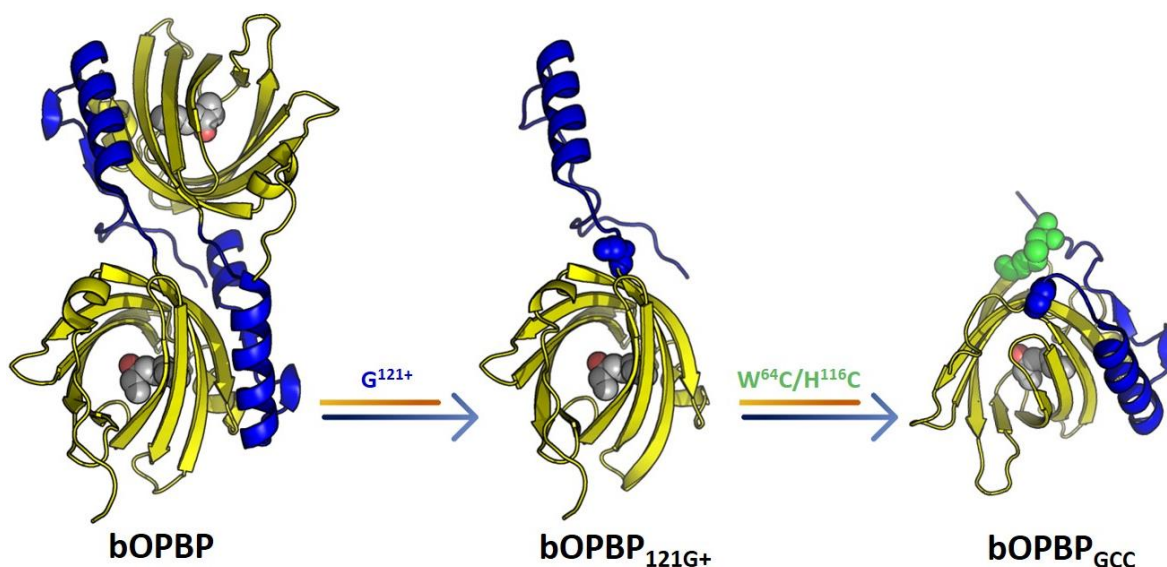
La proteína de unión a odorantes bovina (bOBP) se encuentra en gran abundancia en la mucosa nasal. Esta proteína se sintetiza en las glándulas nasales laterales y se secretada en la mucosa nasal. Es un destacado miembro de la familia de las lipocalinas debido al mecanismo de intercambio de dominio (“domain swapping”) establecido entre sus subunidades (**Figura 7A**) [56]. Este mecanismo no se ha observado en ninguna otra lipocalina.



**Figura 7.** Representación esquemática de la estructura de la proteína de unión a odorantes bovina (bOBP) (PDB 1G85). **(A)** bOBP forma homodímeros a través de un mecanismo de intercambio de dominio entre las subunidades, dado por la interacción recíproca de la hélice  $\alpha$  de una subunidad con el barril  $\beta$  de la otra subunidad. **(B)** Un puente salino que se forma entre los residuos Arg<sup>96</sup>, localizado en el bucle 6, y Glu<sup>125</sup>, ubicado al inicio de la hélice  $\alpha$  del carboxilo terminal es crucial para estabilizar el intercambio de dominios.

En el dímero bOBP, el segmento C-terminal (38 residuos que abarcan dos hélices, una hebra- $\beta$  y un giro) se separa de su dominio estructural y flanquea la otra subunidad completando una estructura típica de lipocalina, mientras que la otra subunidad hace el mismo intercambio en una forma simétrica [56][57]. bOBP presenta un puente salino entre las cadenas laterales de los residuos Arg<sup>96</sup> y Glu<sup>125</sup>, lo que contribuye a que el dominio helicoidal de una subunidad permanezca extendido y empaquetado contra el barril  $\beta$  de la otra subunidad, dando pauta a la formación de la estructura cuaternaria [56] (**Figura 7B**). A pH ácido la proteína se monomeriza, lo que refuerza la importancia de este puente salino en la formación del dímero [58]. Interesantemente, la inserción de un residuo de Gly después de la posición 121 revierte el intercambio de dominio, quizás debido al incremento en la distancia entre los residuos que forman el puente salino mencionado anteriormente, produciendo una mutante completamente monomérica (bOBP<sub>121G+</sub>)(**Figura 8**), pero no un

empaquetamiento compacto de la región C-terminal [59]. Para lograr la conformación monomérica de lipocalina empaquetada, fue necesario insertar un puente disulfuro en bOBP<sub>121G+</sub> conectando el C-terminal al barril-β (triple mutante llamada bOBP<sub>GCC</sub>)(Figura 8) [60].

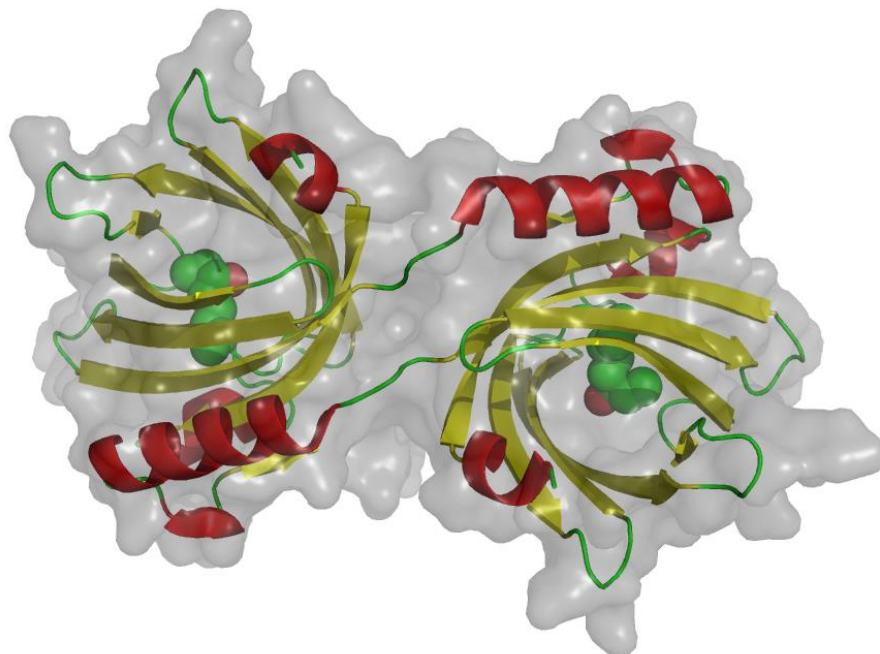


**Figura 8.** Representación esquemática de la estructura 3D de bOBP y sus dos mutantes monoméricas, bOBP<sub>121G+</sub> y bOBP<sub>GCC</sub>. La inserción de una Gly (esferas azules) después de la posición 121 produjo bOBP<sub>121G+</sub>, una proteína completamente monomerizada con su región C-terminal expuesta al disolvente [59]. Mutaciones adicionales para reemplazar W64 y H116 con Cys (esferas verdes) producen la triple mutante bOBP<sub>GCC</sub>, la cual forma un puente disulfuro que empaqueta el C-terminal contra su propio barril-β [60]. Las representaciones de bOBP y bOBP<sub>GCC</sub> fueron generadas utilizando los archivos PDB 1g85 y 2h1v, respectivamente. La estructura bOBP<sub>121G+</sub> no ha sido resuelta experimentalmente. Un modelo de esta mutante fue construido en este estudio, insertando un residuo de Gly en la posición correspondiente en la estructura bOBP. Los residuos correspondientes al dominio de intercambio están en color azul.

### 3.6.2 Sitio de unión al ligando

El sitio de unión al ligando de bOBP, al igual que la mayoría de las lipocalinas, presenta un entorno hidrofóbico. Está compuesto de siete cadenas laterales aromáticas (Phe<sup>36</sup>, Phe<sup>40</sup>, Phe<sup>54</sup>, Phe<sup>56</sup>, Phe<sup>89</sup>, Phe<sup>119</sup>, Tyr<sup>83</sup>), seis alifáticas (Ala<sup>71</sup>, Ala<sup>81</sup>, Ala<sup>101</sup>, Val<sup>69</sup>, Ile<sup>22</sup>, Leu<sup>15</sup>), y cuatro polares (Asn<sup>87</sup>, Asn<sup>103</sup>, Thr<sup>38</sup>, Thr<sup>116</sup>) [56], lo que lo hace un sitio de unión adecuado para diversas moléculas de carácter hidrofóbico [18]. Se ha resuelto cristalográficamente la estructura tridimensional de bOBP con el sitio de unión ocupado por su ligando natural (**Figura 9**) y otros ligandos artificiales [61]. Aunque cada ligando muestra una orientación diferente, debido a su forma y longitud, todos ellos están completamente enterrados dentro de la cavidad de la proteína. Estos ligandos muestran contactos hidrofóbicos y de apilamiento con los residuos de su

entorno. En las estructuras de bOBP con octenol y con aminoantraceno (PDB 1GT1) aparece una molécula de agua junto al ligando, orientada cerca del residuo Thr<sup>38</sup>, con quien establece un puente de hidrógeno. Hasta el día de hoy, no se ha resuelto la estructura de la proteína en su forma apo, por lo que no se sabe si la proteína se encuentra completamente deshidratada como bβlg [44] o hidratada sub-óptimamente como mMUP-I [55].



**Figura 9.** Estructura con ligando de la proteína bOBP (PDB 1G85). Los sitios de unión se encuentran ocupados por el ligando 1-octen-3-ol (OCT), representado por esferas verdes. La proteína mantiene a los ligandos completamente ocultos al cúmulo de aguas del seno acuoso.

### 3.6.3 Función

El ligando natural de bOBP es el alcohol 1-octen-3-ol (OCT), un compuesto volátil del aliento bovino el cual es un potente atrayente de insectos [62]. En consecuencia, se ha propuesto que una de las funciones de bOBP es recoger OCT del entorno nasal para reducir la incidencia de insectos y, por consiguiente, su picadura [61,63]. También se ha especulado que, como las OBP de otros organismos [64], el ortólogo bovino está involucrado en el proceso olfativo al servir como un transportador de odorantes no polares, solubilizándolos y entregándolos a los receptores olfativos [65]. Además, se ha propuesto que tiene un papel de amortiguador, capturando moléculas odorantes que se encuentran saturando los receptores olfativos, y así evita la desensibilización de los mismos [66].

### 3.7 Planteamiento del problema

Los determinantes energéticos que gobiernan la afinidad y especificidad de las lipocalinas por sus ligandos siguen siendo uno de los aspectos menos comprendidos del funcionamiento de este tipo de proteínas. La limitada información disponible a la fecha nos impide conocer las características, tanto cualitativas como cuantitativas, del efecto hidrofóbico en la interacción entre las lipocalinas y sus ligandos. A su vez, limita considerablemente el potencial uso de estas proteínas en aplicaciones biomédicas y biotecnológicas. Hasta ahora, son muy pocas las lipocalinas cuyas propiedades termodinámicas se han caracterizado detalladamente. Esta interacción proteína-ligando involucra componentes entálpicos y entrópicos, los cuales se manifiestan con los cambios en el número de interacciones y grados de libertad de todas las moléculas involucradas en el sistema de estudio, incluyendo las moléculas de disolvente. Para contribuir a profundizar sobre las bases moleculares del reconocimiento de ligandos por las lipocalinas, en este estudio hicimos uso de técnicas de calorimetría de alta precisión y simulaciones de dinámica molecular para caracterizar el reconocimiento de ligandos de bOBP y su mutante monomérica. Uno de los principales factores limitantes para el estudio termodinámico de las lipocalinas en general ha sido la pobre hidrosolubilidad de la mayoría de los ligandos, lo cual complica importantemente su estudio mediante técnicas calorimétricas. De entre los diversos ligandos que puede unir bOBP, su ligando fisiológico OCT posee una solubilidad pertinente ( $\sim 10$  mM) para realizar la caracterización calorimétrica. Además, planteamos el estudio del ligando congénico HEX. A partir del análisis comparativo de los parámetros de unión de los dos ligandos, buscamos evaluar el impacto que tiene el tamaño de la cadena alifática en la estabilidad de la interacción. Actualmente, el papel que juega la oligomerización en el funcionamiento de las lipocalinas sigue sin ser elucidado. Entre las lipocalinas, bOBP se distingue por ser la única que muestra un mecanismo de dimerización basado en un intercambio de dominios entre las dos subunidades. Como se indicó anteriormente, la introducción mediante técnicas de biología molecular de un residuo de Gly después de la posición 121 de la cadena polipeptídica produjo una proteína recombinante completamente monomérica. Los datos espectroscópicos con los que se cuenta hasta el momento indican que el dominio de intercambio de la mutante bOBP<sub>121G+</sub> se encuentra expuesto al disolvente, sin formar interacciones estables con su propio barril  $\beta$ . Por tanto, bOBP<sub>121G+</sub> se ha considerado como un buen emulador de las subunidades disociadas de bOBP silvestre. Con el fin de evaluar cuantitativamente el papel que juega la oligomerización en la capacidad de reconocimiento de bOBP, se realizó un estudio comparativo de bOBP y bOBP<sub>121G+</sub>.



## **4 Hipótesis**

A través de la caracterización experimental y computacional del proceso de reconocimiento de ligandos hidrofóbicos de diferente longitud por parte de la proteína dimérica bOBP y de su mutante monomérica bOBP121G+, será posible resolver propiedades que determinan el efecto hidrofóbico no clásico observado recurrentemente en las lipocalinas, así como elucidar el papel que juega la oligomerización en dicho proceso.

## 5 Objetivo general

Elucidar las bases moleculares de la afinidad por ligandos hidrofóbicos de la lipocalina proteína de unión a odorantes bovina.

## 6 Objetivos particulares

- Expresar y purificar la proteína recombinante bOBP y su mutante monomérica bOBP<sub>121G+</sub>.
- Evaluar la estabilidad estructural de ambas proteínas determinando los perfiles de perturbación térmica mediante calorimetría diferencial de barrido y dicroísmo circular.
- Caracterizar por calorimetría de titulación isotérmica los parámetros de unión de ligando de bOBP y de bOBP<sub>121G+</sub>.
- A partir del análisis comparativo de las propiedades del dímero silvestre y la mutante monomérica, elucidar el papel que juega la dimerización de bOBP.
- Del análisis comparativo de las propiedades de unión al ligando fisiológico octenol y a la molécula congénica hexenol, determinar la contribución energética por grupo de metileno.
- Caracterizar mediante simulaciones de dinámica molecular de larga duración en disolvente explícito y sin restricciones, las propiedades conformacionales y de solvatación de la lipocalina en ausencia y presencia de ligando.
- Correlacionar los resultados obtenidos experimentalmente e *in silico*, para determinar las bases moleculares de la afinidad de bOBP por sus ligandos.



## 7 Materiales y métodos

### 7.1 Materiales

Los reactivos químicos se compraron a Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA) o Goldbio (St. Louis, MO, USA). A menos que se indique otra cosa, todos los experimentos se realizaron en una solución amortiguadora de fosfatos 20 mM, pH 7.4, suplementada con 100 mM de NaCl.

### 7.2 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes

Los plásmidos de bOBP y bOBP<sub>121G+</sub> con una 6xHis-tag en el N-terminal clonadas en el vector pt7-7 fueron amablemente proporcionadas por el Dr. Roberto Ramoni, Universidad de Parma, Italia. La expresión de la proteína se llevó a cabo en la cepa Rosetta de *E. coli*. Los preinóculos, crecidos durante la noche a 37 °C en medio LB, se diluyeron 1:100 en medio de cultivo fresco con ampicilina (100 µg/ml) y se incubaron a 37 °C hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> de 0.5-0.6. En ese momento, se adicionó 0.5 mM de isopropil-beta-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a los cultivos, y se incubaron a 30 °C durante 5 h. El cultivo celular (1.5 litros) se cosechó por centrifugación (10 min. a 5,500xg, 4 °C), para posteriormente suspenderlo en 40 ml de amortiguador de lisis (100 mM de fosfatos, 200 mM de NaCl, 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo, pH 7.4) y lisarlas por sonicación con un equipo Misonix 3000, usando intervalos de velocidad de pulso de 20 segundos encendido y 40 segundos apagado, por 10 min. a 4 °C. La fracción soluble se clarificó por centrifugación (45 min. a 30,000xg), filtración y cromatografía de afinidad (His-Trap-FF, GE Healthcare, USA). Antes de inyectar la muestra, la columna de afinidad se equilibró con 5 volúmenes de columna de amortiguador de unión (amortiguador de lisis + 30 mM de imidazol). La proteína no asociada a la columna se eliminó con 5 volúmenes de columna del amortiguador de unión, y las proteínas recombinantes se eluyeron con 5 volúmenes de columna de amortiguador de unión con 500 mM de imidazol. Para remover los ligandos co-purificados, la proteína recombinante se mezcló con etanol (1:2 volumen:volumen), e incubó 2 h a 4 °C. El precipitado se recuperó después de centrifugar (20 min. a 7,000xg, 4 °C) y liofilizar. Finalmente, la proteína se dializó por 2 x 12 h en 20 mM de fosfatos, 100 mM NaCl, pH 7.4. La pureza de la proteína se evaluó a través de SDS-PAGE con geles de poliacrilamida al 12%. La concentración de la proteína se determinó utilizando un coeficiente de extinción de 23,500 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> a 280 nm por monómero equivalente [67].

### 7.3 Dispersión dinámica de luz (DLS)

Los experimentos por DLS se llevaron a cabo con un DynaPro-801 molecular sizing instrument (Protein Solutions Co.) como se describió previamente [68], utilizando una concentración de proteína en el intervalo 0.03-0.15 mM. El radio

hidrodinámico ( $R_H$ ) y la masa molecular aparente se calcularon a partir de un análisis de autocorrelación de datos de intensidad de dispersión de luz.

#### 7.4 Dicroísmo circular (CD)

Los espectros de CD se realizaron con un espectropolarímetro JASCO J-720 acoplado a un peltier PTC-348WI. Se utilizó una celda de cuarzo con un paso de luz de 2 mm. La proteína se sometió a un ciclo de calentamiento/enfriamiento en el intervalo de temperatura de 20 a 85 °C siguiendo el cambio de señal de DC en el UV lejano. Se hizo un barrido térmico a velocidad constante de 1 °C/min, y seguido a una longitud de onda fija de 217 nm. La proteína analizada se disolvió en un buffer de fosfatos 20 mM, NaCl 100 mM pH 7.2.

#### 7.5 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Las mediciones por DSC se llevaron a cabo con un equipo MicroCal VP-Capillary DSC (Malvern Panalytical Inc., USA). Las líneas base se determinaron bajo las mismas condiciones experimentales y se restaron de las trazas calorimétricas correspondientes. Para determinar la reversibilidad calorimétrica del proceso de desnaturalización, las muestras se recalentaron. Todos los resultados se obtuvieron a una velocidad de barrido de 60 °C/h. Las endotermas se ajustaron a modelos de transición de desplegamiento independiente programados en el software MicroCal Origin v7 (OriginLab Co., MA, USA).

#### 7.6 Calorimetría de titulación isotérmica (ITC)

Las mediciones por ITC se hicieron utilizando un instrumento MicroCal™ iTC200 (GE Healthcare, Northampton, MA, USA). El programa de titulación consistió en 15 a 35 inyecciones consecutivas de ligando con un intervalo de 5 min. entre inyecciones, usando una velocidad de agitación de 750 rpm. El calor de dilución del ligando se obtuvo agregando ligando a una solución amortiguadora bajo las mismas condiciones y el mismo programa de titulación usado con las muestras de proteína. Todas las muestras se desgasificaron por 10 min. previo a los experimentos. Los parámetros de unión se determinaron utilizando un modelo de sitios idénticos e independientes:

$$Q = \frac{nM_t \Delta H_a V_0}{2} \left[ 1 + \frac{L_t}{nM_t} + \frac{1}{nK_a M_t} - \sqrt{\left( 1 + \frac{L_t}{nM_t} + \frac{1}{nK_a M_t} \right)^2 - \frac{4L_t}{nM_t}} \right]$$

donde Q es el calor normalizado por mol de ligando al final de la i-ésima inyección,  $K_a$  es la constante de unión,  $\Delta H_a$  es el cambio de entalpía, n es la estequiometría,  $V_0$  es el

volumen en la celda de reacción, y  $L_t$  y  $M_t$  son las concentraciones totales del ligando y macromolécula, respectivamente. El calor intercambiado en la  $i$ -ésima inyección es:

$$\Delta Q_i = Q_i + \frac{v_i(Q_i + Q_{i-1})}{2V_0} - Q_{i-1} + q_{dil}$$

donde  $v_i$  es el volumen de la alícuota agregada en la inyección  $i$  y  $q_{dil}$  es un término de ajuste introducido para considerar el efecto de calor de dilución experimental.

El método KinITC [69], implementado en el programa de análisis AFFINmeter [70], se utilizó para extraer la información cinética de la curva de potencia diferencial de ITC. La curva de tiempo de equilibrio, construida del análisis del tiempo requerido para que la señal calorimétrica regrese a la línea base después de una inyección, se ajustó para determinar las constantes cinéticas de asociación ( $k_{on}$ ) y disociación ( $k_{off}$ ).

Todas las regresiones no lineales se realizaron utilizando los programas MicroCal Origin v7 y AFFINmeter [70].

## 7.7 Simulaciones por dinámica molecular

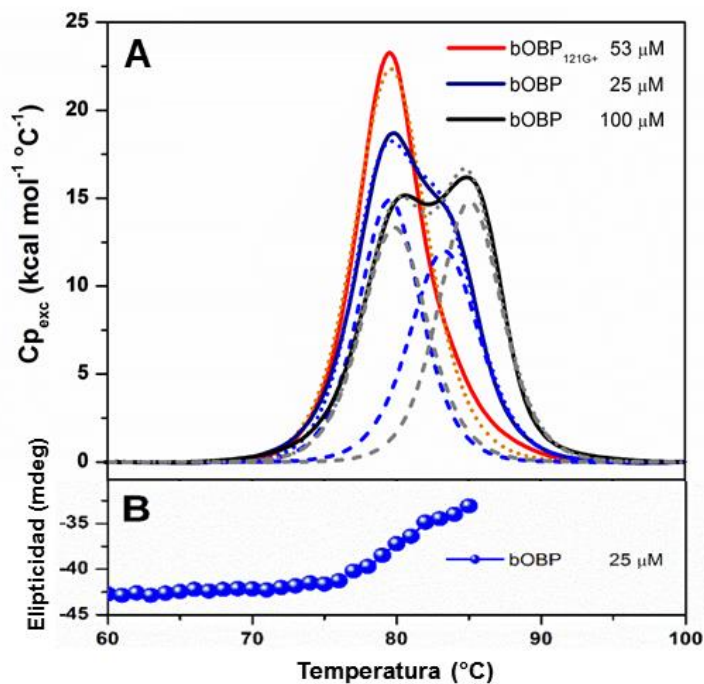
Se realizó 1  $\mu$ s de tiempo de simulación para cada sistema con la suite AMBER 14, utilizando el campo de fuerza FF99SB [71]. Los ligandos 1-octen-3-ol y 1-hexen-3-ol se parametrizaron con el campo de fuerza para moléculas orgánicas (GAFF) y la suite ANTECHAMBER [72]. La protonación a pH 7.4 y fuerza iónica de 0.1 se realizó utilizando el programa H++ [73]. La caja de solvatación octaédrica se generó con una distancia mínima de 18 Å de la proteína al borde de la caja, utilizando el modelo de disolvente TIP3P. Los contraiones se colocaron en posición aleatoria para neutralizar el sistema. Se utilizaron condiciones periódicas de frontera, y las simulaciones se realizaron en un ensamble NPT (37 °C, 1 atm). Para calcular las interacciones electrostáticas de largo alcance, se usó el método PME (particle-mesh Ewald) tal como se aplica en el módulo de PMEMD de la suite de AMBER, utilizando un valor de cut-off de 9 Å para dividir la sumatoria de Ewald y la electrostática directa. Se habilitó el algoritmo SHAKE. Se realizó minimización por gradiente conjugado (5000 pasos) seguido por calentamiento NVT (0.8 ns) y un equilibrado NPT (1 ns) usando dinámica de Langevin para equilibrar el disolvente y relajar la estructura. Los archivos de ejecución se generaron con ayuda del programa pyMDmix [74]. Los análisis de las trayectorias se realizaron con los programas CPPTRAJ [75] y VMD [76]. La contribución electrostática ( $E_{elec}$ ) y de van der Waals ( $E_{vdW}$ ) para el análisis de cada molécula de agua se modelaron utilizando los potenciales Coulomb y Lennard-Jones, respectivamente; las energías se calcularon usando el comando LIE de CPPTRAJ, aplicando un cutoff de 12 Å. Los volúmenes de las cavidades de unión se calcularon con el programa Fpocket [77]. Los acoplamientos de los ligandos sobre la proteína se realizaron utilizando el programa AutoDock Vina [78], permitiendo la flexibilidad del ligando. Las representaciones moleculares se produjeron con el programa PYMOL [79].



## 8 Resultados

### 8.1 Estabilidad térmica del dímero silvestre bOBP y su mutante monomérica bOBP<sub>121G+</sub>

La estabilidad térmica de bOBP y bOBP<sub>121G+</sub> se evaluó por DSC (**Figura 10A**). bOBP mostró endotermas con dos picos, mientras bOBP<sub>121G+</sub> mostró un único pico simétrico (**Figura 10A**). Las trazas calorimétricas del monómero y dímero se ajustaron a un modelo de desplegamiento de una y dos transiciones, respectivamente. El análisis por desconvolución mostró que el desplegamiento de bOBP<sub>121G+</sub> es consistente con un proceso de dos estados ( $\Delta H_{vH}/\Delta H_{cal} = 0.96$ ;  $\Delta H_{cal} = 151 \text{ kcal mol}^{-1}$ ), con una temperatura media ( $T_m$ ) de  $79.6 \pm 0.0 \text{ }^\circ\text{C}$ . En el caso del dímero, el cual mostró un perfil de desplegamiento consistente con dos transiciones, la  $T_m$  del primer pico fue independiente de la concentración de proteína, con un valor cercano al de la mutante monomérica ( $79.5 \pm 0.0$  y  $79.8 \pm 0.0 \text{ }^\circ\text{C}$  para la baja y alta concentración de proteína, respectivamente). En contraste, la  $T_m$  del segundo pico mostró una variación significativa con la concentración de proteína ( $83.4 \pm 0.0$  y  $85.4 \pm 0.0 \text{ }^\circ\text{C}$  para la baja y alta concentración de proteína, respectivamente), indicando el suceso de la disociación del dímero. Las endotermas calorimétricas coincidieron con el perfil térmico obtenido por dicroísmo circular (DC) en el UV-lejano (260-178 nm) (**Figura 10B**). De este modo, el efecto térmico mostrado por las proteínas ocurrió junto con la pérdida de estructura secundaria. Para verificar el estado de agregación de las proteínas, se hicieron mediciones por DLS a temperatura ambiente. El tamaño aparente de bOBP ( $R_H = 3.1 \pm 0.1 \text{ nm}$  y  $MM = 44 \pm 2 \text{ kDa}$ ) fue un poco mayor al calculado por la secuencia de aminoácidos ( $18.5 \text{ kDa} \times 2$  subunidades), lo cual es consistente con la forma moderadamente elongada del dímero ( $\sim 40 \times 40 \times 70 \text{ \AA}^3$  [56]). En contraste, el tamaño aparente de bOBP<sub>121G+</sub> ( $R_H = 2.4 \pm 0.2 \text{ nm}$  y  $MM = 27 \pm 2 \text{ kDa}$ ) fue significativamente mayor al obtenido por la secuencia de aminoácidos ( $18.6 \text{ kDa}$ ), una diferencia que es consistente con el modelo que establece que la hélice alfa en el C-terminal no está empacada contra su propio barril beta [59,60]. Juzgando por el índice de polidispersidad  $\leq 20\%$ , ambas proteínas se encontraron predominantemente monodispersas. Tomados en su conjunto, estos resultados mostraron que ambas proteínas tienen una alta resistencia térmica, preservando su conformación nativa a temperaturas tan altas como  $70 \text{ }^\circ\text{C}$ . El desplegamiento térmico de bOBP recombinante involucra el desplegamiento de las subunidades monoméricas y asociadas, las cuales coexisten a altas temperatura bajo un régimen de intercambio lento, mientras que la estabilidad de la mutante monomérica bOBP<sub>121G+</sub>, cuyo desplegamiento se ajusta a un modelo simple de dos estados, es muy similar al de las subunidades disociadas de la proteína silvestre.

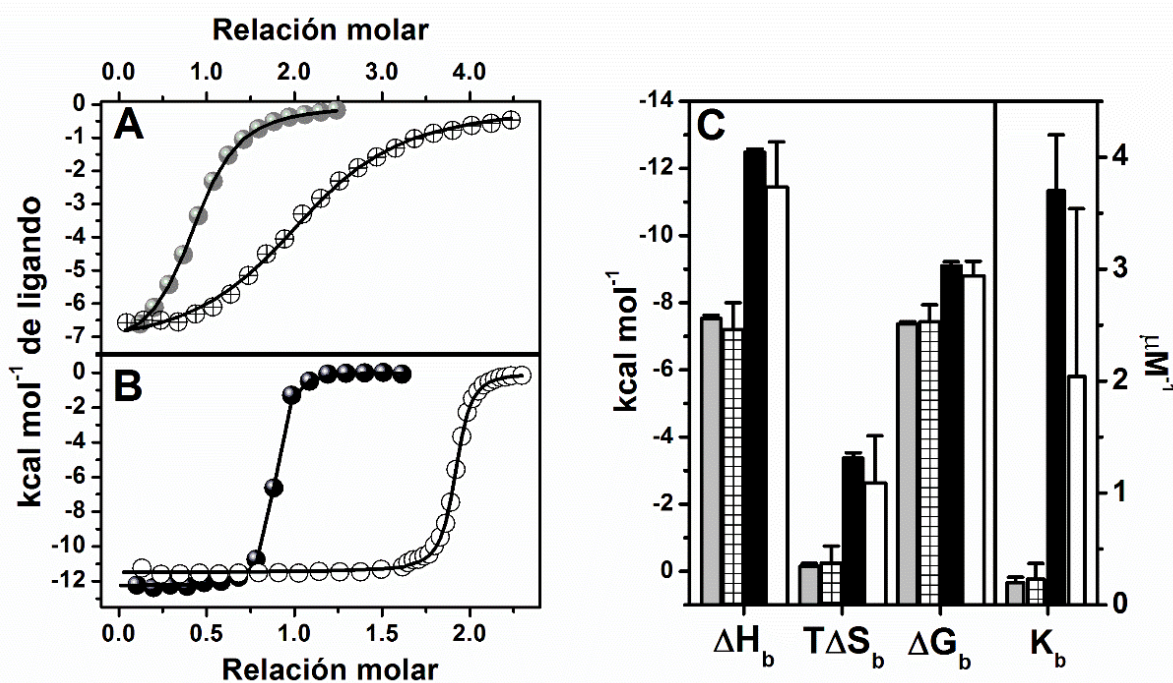


**Figura 10.** Despliegamiento térmico de bOBP y su mutante monomérica bOBP<sub>121G+</sub>. **A)** Endotermas obtenidas por DSC. Las endotermas experimentales (líneas solidas) de las proteínas monomérica y dimérica se ajustaron a un modelo de equilibrio de una y dos transiciones, respectivamente. Las líneas discontinua y punteada corresponden a las transiciones global e individual respectivamente, resultado del mejor ajuste de los modelos correspondientes a las trazas calorimétricas. La T<sub>m</sub> calculada para el monómero fue de 79.6±0.0 °C. Los valores aparentes para el dímero fueron de T<sub>m1</sub>=79.5±0.0 °C, T<sub>m2</sub>=83.4±0.0 °C y T<sub>m1</sub>=79.8±0.0 °C, T<sub>m2</sub>=85.4±0.0 °C para las corridas con baja y alta concentración de proteína, respectivamente. De acuerdo con el área recuperada en un segundo barrido térmico, la reversibilidad del despliegamiento de bOBP y bOBP<sub>121G+</sub> fue ~50 y 80 % respectivamente. **B)** Despliegamiento térmico de bOBP seguido por el cambio en la señal de DC a 217 nm. Las mediciones de hicieron en 0.02 M de fosfatos, 0.1 M NaCl, pH 7.4, a una velocidad de barrido de 1 °C min<sup>-1</sup>.

## 8.2 Caracterización energética de unión al ligando de bOBP y bOBP<sub>121G+</sub>

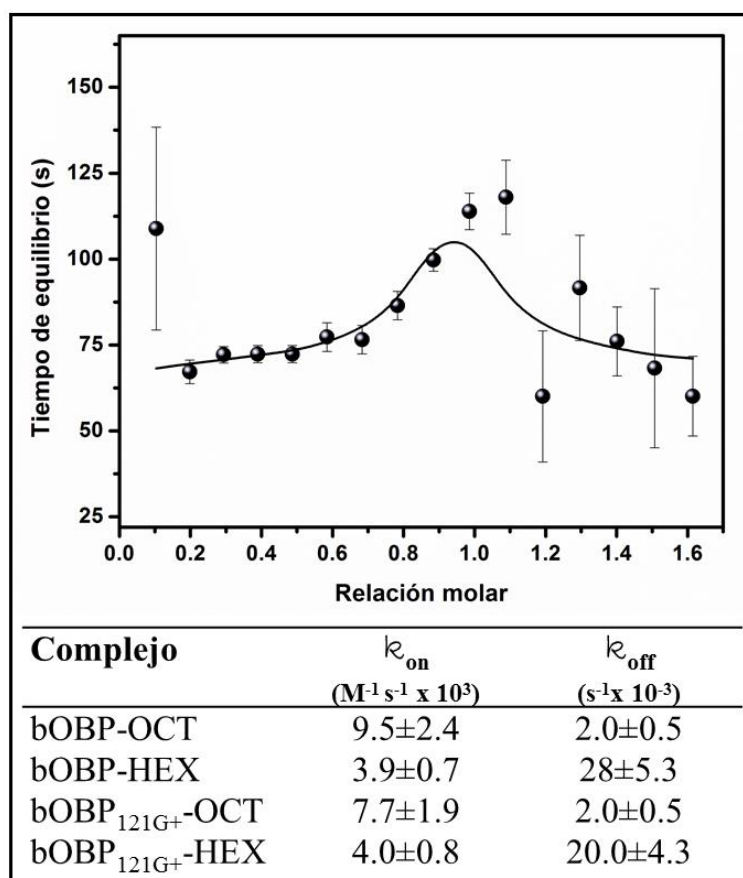
Las energías de unión de HEX y OCT con bOBP y bOBP<sub>121G+</sub> se determinaron por ITC (**Figura 11**). Se obtuvieron estequiometrías de unión de 0.3 – 0.5 moles de OCT por mol de subunidad monomérica en las mediciones iniciales, sugiriendo una ocupación parcial del sitio de unión por ligando copurificado. Después de la deslipidación con etanol, la estequiometría varió consistentemente dentro de un intervalo de 0.85 – 1.05. Las isotermas se ajustaron satisfactoriamente usando un modelo de sitios idénticos e independientes, sin evidencias de cooperatividad entre las unidades (**Figura 11A-B**). Dentro de la incertidumbre experimental, ambas proteínas mostraron las mismas propiedades energéticas de unión, indicando que el

estado de oligomerización no afecta la capacidad de unión de la lipocalina. Las firmas termodinámicas describieron una interacción de afinidad milimolar entálpicamente dirigida para ambos ligandos, acompañada por un pequeño decremento entrópico (**Figura 11C**). La falta de dos grupos metilenos en HEX con respecto a OCT provocó un decremento de un orden de magnitud en  $K_b$ . Este decremento en la afinidad fue debido a una entalpía de unión marcadamente menos favorable ( $\Delta\Delta H_{HEX}^{OCT} \sim -5$  kcal/mol), el cual es comparable a la entalpía de formación de un puente de hidrógeno en el vacío [53]. Debido a que los datos crudos de calorimetría corresponden a la diferencia de potencia como función del tiempo, fue posible extraer los parámetros cinéticos de los datos de ITC usando el método kinITC [69] implementado en el programa AFFINImeter [70], el cual considera la variación del tiempo de retorno al equilibrio en cada inyección (**Figura 12**). Las constantes de velocidad de asociación ( $k_{on}$ ) y de disociación ( $k_{off}$ ) se determinaron de los datos calorimétricos crudos. Consistentemente, ambas proteínas mostraron constantes cinéticas muy similares. En el caso de OCT, los valores de  $k_{off}$  corresponden a una vida media de disociación ( $t_{1/2}$ ) de  $\sim 6$  min, la cual concuerda con el valor previamente reportado para la disociación de bOBP y el ligando 3,7-dimetiloctan-1-ol etiquetado isotópicamente [80]. La unión de HEX mostró una  $k_{on}$  algo más lenta y una  $k_{off}$  un orden de magnitud más rápida ( $t_{1/2} \sim 0.5$  min) en comparación con el ligando OCT (**Figura 12**). En general, las constantes cinéticas calorimétricas aportan un mayor respaldo a la conclusión de que bOBP y bOBP<sub>121G+</sub> poseen propiedades de unión a ligando muy similares.



**Figura 11.** Determinación calorimétrica de los parámetros de unión a ligando. Símbolos y barras grises, cuadrículados, negros y blancos corresponden a los datos de interacción de bOBP<sub>121G+</sub>-HEX, bOBP-HEX, bOBP<sub>121G+</sub>-OCT, y bOBP-OCT, respectivamente. A) Curvas isotérmicas de unión de titulación de 25 μM

bOBP (equivalente de dímero) o 50  $\mu\text{M}$  bOBP<sub>121G+</sub> con 1.3 mM HEX. **B)** Curvas isotérmicas de unión para la titulación de 5  $\mu\text{M}$  bOBP (equivalente de dímero) o 10  $\mu\text{M}$  bOBP<sub>121G+</sub> con 170  $\mu\text{M}$  OCT. La línea sólida corresponde al mejor ajuste de un modelo de unión de sitios idénticos e independientes. **C)** Firmas termodinámicas de unión. Todas las mediciones se hicieron al menos por triplicado a 30 °C en 0.02 M fosfatos, 0.1 M NaCl, pH 7.4. No se observaron diferencias significativas entre las medias aritméticas de los parámetros termodinámicos de bOBP y bOBP<sub>121G+</sub> (Anexo 1).

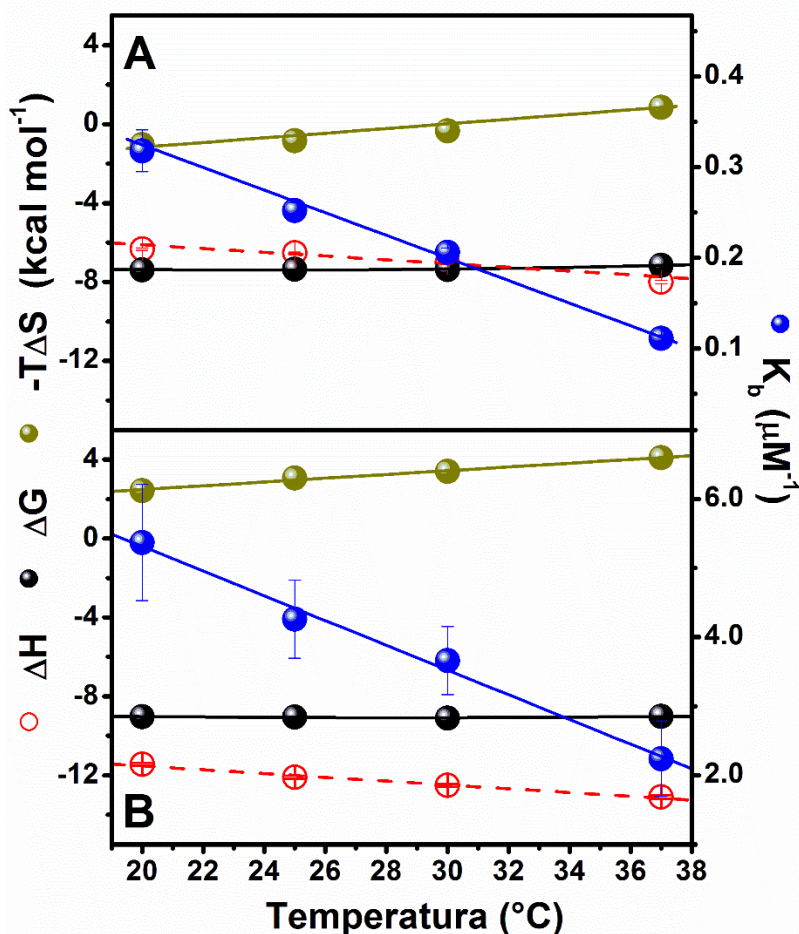


**Figura 12.** Curva de tiempo de equilibrio calorimétrico y constantes cinéticas determinadas usando el método kinITC [70]. Como ejemplo de los resultados experimentales, se muestra la curva de tiempo de equilibrio para el complejo bOBP<sub>121G+</sub>-OCT. Las mediciones se hicieron en una solución amortiguadora 0.02 M de fosfatos, 0.1 M NaCl, pH 7.4, a 30 °C.

Para obtener la firma termodinámica de unión completa, se hicieron titulaciones calorimétricas en función de la temperatura. Como revela el tamaño de las barras de error correspondientes (**Figura 11C**), se observó una considerable dispersión de los parámetros de unión de bOBP entre los experimentos independientes, probablemente a causa de la heterogeneidad en la preparación de las muestras de la proteína bOBP recombinante, tal como se documenta en la referencia [81]. Por el contrario, las mediciones para la mutante monomérica mostraron una



menor dispersión en los datos, lo cual permitió una determinación confiable del  $\Delta C_p_b$ . El perfil termodinámico de unión de bOBP<sub>121G+</sub> a los ligandos HEX y OCT como función de la temperatura se muestran en la **Figura 13**. Los valores de  $\Delta C_p_b$  de ambos ligandos fueron similares dentro de la incertidumbre experimental ( $\Delta C_p_b^{\text{HEX}} = -95 \pm 6$  vs  $\Delta C_p_b^{\text{OCT}} = -97 \pm 7$  cal mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>). Por tanto, la diferencia en la entalpía y entropía de unión entre HEX y OCT fueron prácticamente constantes dentro del intervalo de temperatura evaluado.



**Figura 13.** Parámetros de unión termodinámica de bOBP<sub>121G+</sub> a HEX (A) y OCT (B) como una función de la temperatura. Las líneas rojas punteadas corresponden al mejor ajuste de una línea recta para los datos de entalpía de unión. Las mediciones se hicieron en un amortiguador de fosfatos 0.02 M, 0.1 M NaCl, pH 7.4.

### 8.3 Análisis de parámetros de unión como una función de la longitud del ligando

Al igual que bOBP, mMUP-I y rOBP3 son dos lipocalinas cuya cavidad de unión está completamente cerrada. Estas dos lipocalinas también muestran un efecto hidrofóbico no clásico en la unión con sus ligandos. Dado que la unión de mMUP-I y rOBP3 se han caracterizado en función de la longitud del ligando mediante una serie de alcoholes alifáticos primarios [51,82] y  $\gamma$ -lactonas [8], respectivamente, fue posible realizar una comparación directa de los parámetros energéticos por mol de grupo metileno ( $\Delta X_{CH_2}$ ). Las contribuciones energéticas específicas de estas dos lipocalinas, así como las de bOBP<sub>121G+</sub>, se resumen en la **Tabla 3**. Una inspección de los datos reveló que ninguno de los parámetros específicos de unión muestra un comportamiento consenso entre las tres lipocalinas. bOBP<sub>121G+</sub> y mMUP-I muestran un valor favorable y muy similar de  $\Delta G_{CH_2}$ , mientras que el valor de rOBP3 es virtualmente isoergónico. Notablemente, mientras que bOBP<sub>121G+</sub> y mMUP-I muestran una contribución favorable en  $\Delta H_{CH_2}$  y desfavorable en  $T\Delta S_{CH_2}$ , rOBP3 presenta contribuciones opuestas. Por tanto, aunque las tres lipocalinas exhiben una firma *general* de efecto hidrofóbico no clásico, claramente difieren en las bases moleculares para el reconocimiento de sus ligandos al tomarse como referencia la contribución por grupo metileno: bOBP<sub>121G+</sub> y mMUP-I muestran una firma *específica* no clásica, mientras que rOBP3 presenta una firma *específica* clásica. A su vez, bOBP<sub>121G+</sub> y mMUP-I muestran diferencias significativas, con  $\Delta H_{CH_2}$  y  $T\Delta S_{CH_2}$  siendo más negativos en el caso de la primera lipocalina. Además, cada grupo metileno adicional disminuye la capacidad calorífica *específica* ( $\Delta C_{pCH_2}$ ) en mMUP-I con una magnitud cercana a la esperada al desolvatar un grupo metileno de un compuesto modelo alifático [83,84], mientras que la contribución correspondiente es marginal en bOBP<sub>121G+</sub>. En lo global, los datos aquí presentados indican que pese a compartir arquitecturas conformacionales muy similares, bOBP<sub>121G+</sub>, mMUP-I y rOBP3 difieren marcadamente con respecto al mecanismo subyacente que genera la afinidad por sus ligandos.

**Tabla 3.** Energías específicas de unión (por grupo metileno de ligando) de lipocalinas<sup>a</sup>

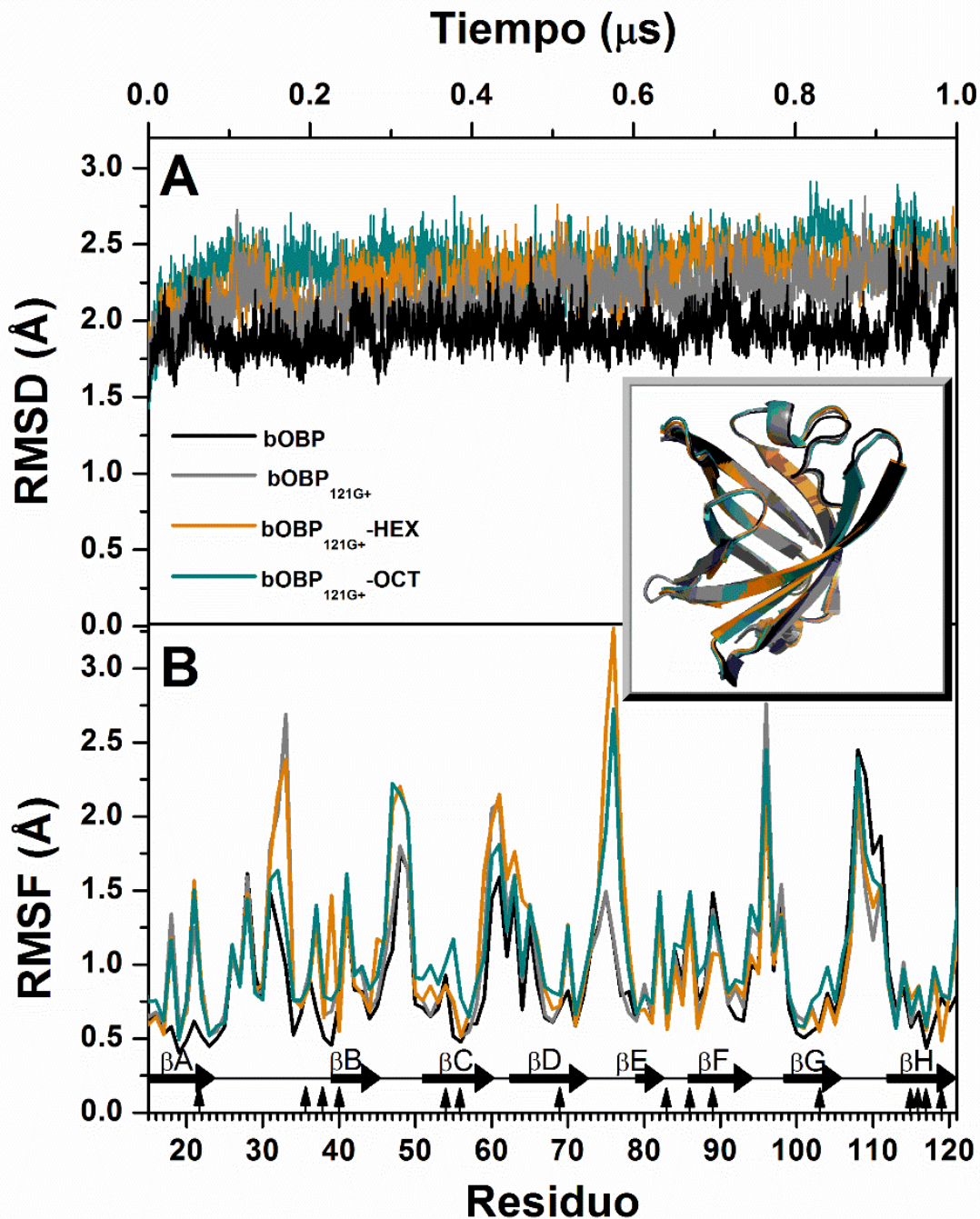
Lipocalina	Ligandos	$\Delta H_{CH_2}$ kcal mol <sup>-1</sup>	$T\Delta S_{CH_2}$ kcal mol <sup>-1</sup>	$\Delta G_{CH_2}$ kcal mol <sup>-1</sup>	$\Delta C_{pCH_2}$ cal mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup>	T °C	Identidad secuencia <sup>b</sup> (%)	Ref.
bOBP <sub>121G+</sub>	hexenol a octenol	-2.5±0.1	-1.6±0.2	-0.9±0.1	-1±4	30	100	Este trabajo [51,82]
mMUP-I	pentanol a nonanol	-1.4±0.0	-0.4±0.0	-1.0±0.0	-12±4	27	24	
rOBP3	$\gamma$ -pentalactone a $\gamma$ -undecalactone	+2.4±0.2	+2.5±0.1	-0.1±0.1	N.D.	25	26	[8]

<sup>a</sup> La unión de  $\beta$ -lactoglobulina con ácidos grasos de diferente longitud se ha caracterizado en dos estudios diferentes [48,49]; sin embargo, ya que los dos grupos de datos conducen a comportamientos opuestos de los parámetros de  $\Delta X_{CH_2}$ , esta lipocalina no se consideró en el presente análisis.

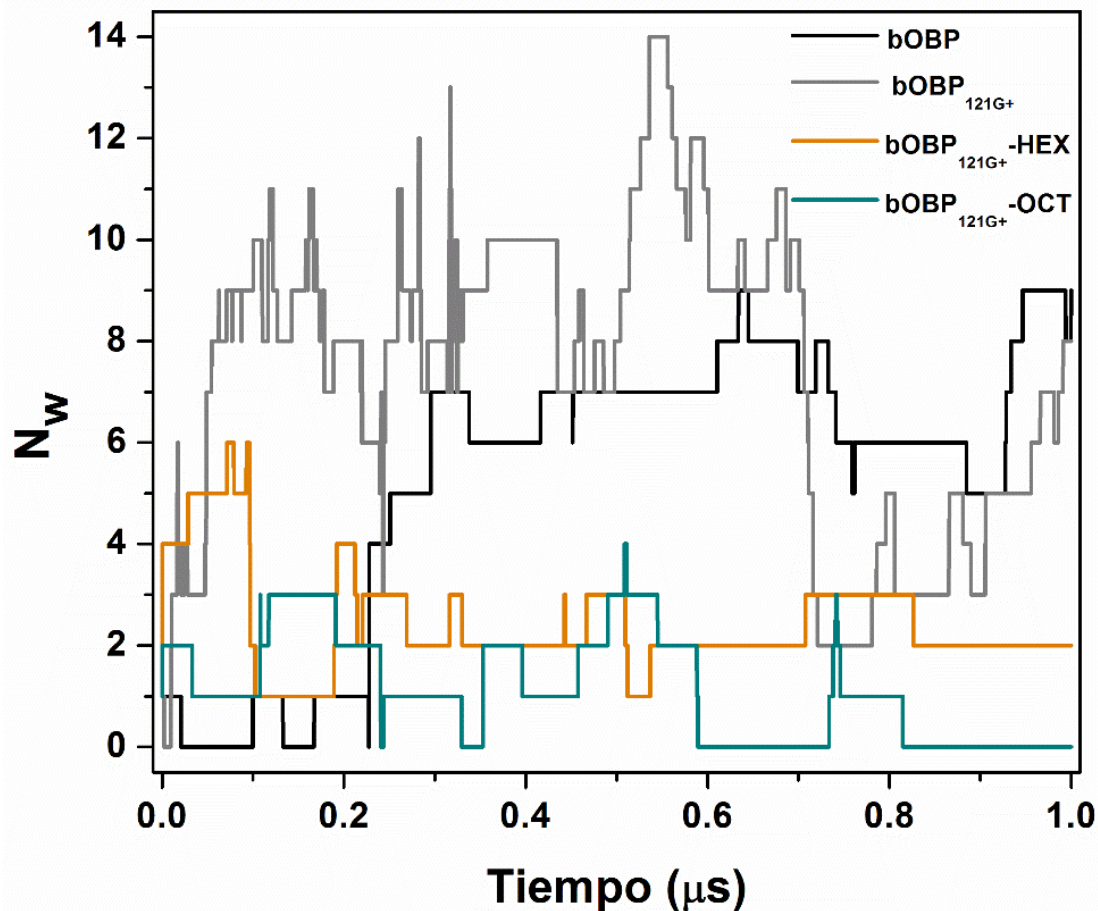
<sup>b</sup> La secuencia de bOBP se tomó como referencia. La identidad de rOBP3 y mMUP-I = 60%

## 8.4 Simulación por dinámica molecular (MD)

Con el fin de investigar las bases moleculares de la interacción dirigida entálpicamente de bOBP y su mutante monomérica con moléculas hidrofóbicas, las propiedades de hidratación y conformacionales de la cavidad de unión se caracterizaron por medio de simulaciones de MD de 1  $\mu$ s de tiempo en disolvente explícito. Ya que la estructura de la forma apo de bOBP no se ha resuelto experimentalmente, se construyó un modelo de ésta a través de remover el ligando de la estructura resuelta por rayos X del complejo bOBP-OCT (PDB 1g85 [61]). Como se muestra en la **Figura 14**, la estructura del barril- $\beta$  permaneció constante durante la simulación, con una estructura promedio muy similar a la estructura cristalográfica de referencia (RMSD = 0.6 Å). El gráfico de RMSD en función del tiempo mostró que la relajación del barril- $\beta$  tomó lugar dentro de los primeros 100 ns de simulación (**Figura 14**). El análisis de la cavidad de unión reveló una hidratación interna significativa y dinámica. La **Figura 15** muestra el curso temporal del número de moléculas de agua completamente inmersas dentro de la cavidad de unión ( $N_w$ ). Durante el tiempo de pre-equilibrado, una molécula fue secuestrada dentro de la cavidad de unión, permaneciendo dentro durante los primeros 20 ns de simulación productiva, después de lo cual fue expulsada. Durante los primeros 230 ns de simulación, una sola molécula fue reabsorbida y liberada repetidamente por la cavidad de la proteína. Entre 230 y 300 ns,  $N_w$  experimentó un marcado incremento hasta alcanzar un valor promedio ( $\bar{N}_w$ ) de  $6.9 \pm 1.0$  durante el resto de la simulación.



**Figura 14.** Fluctuación estructural obtenida de 1  $\mu\text{s}$  de tiempo continuo de simulación por MD en disolvente explícito. **A)** RMSD como una función del tiempo. Recuadro interno: Super posición de las estructuras promedio barril- $\beta$  de cada trayectoria. El RMSD entre las estructuras promedio fue  $< 0.7 \text{ \AA}$ . **B)** Valores de RMSF para los átomos de  $\text{C}\alpha$ . El RMSF promedio del motivo barril- $\beta$  (residuos 15-121) de apo bOBP fue de  $0.9 \pm 0.4 \text{ \AA}$ , mientras que para apo bOBP<sub>121G+</sub> fue de  $1.0 \pm 0.4 \text{ \AA}$ . Las flechas verticales indican la posición de los residuos que bordean la cavidad de la proteína; de izquierda a derecha corresponden a: I<sup>22</sup>, F<sup>36</sup>, T<sup>38</sup>, F<sup>40</sup>, F<sup>54</sup>, F<sup>56</sup>, V<sup>69</sup>, Y<sup>83</sup>, N<sup>87</sup>, F<sup>89</sup>, N<sup>103</sup>, L<sup>115</sup>, T<sup>116</sup>, V<sup>119</sup>, G<sup>117</sup>. Las flechas horizontales indican la posición de las hebras- $\beta$ .



**Figura 15.** Trayectoria temporal del número de moléculas de agua dentro de la cavidad de unión ( $N_w$ ) determinado de 1  $\mu$ s de tiempo de trayectoria de DM. En todos los sistemas, un periodo de pre-equilibrado para  $N_w$  (0.25 ns para bOBP y 0.10 ns para las formas apo y holo de bOBP<sub>121G+</sub>) se descartó para el cálculo del valor promedio  $\bar{N}_w$ .

La estructura de apo bOBP<sub>121G+</sub> y sus complejos con HEX y OCT se construyeron insertando un residuo de Gly después de la posición 121, usando la estructura del complejo bOBP-OCT como plantilla (**Figura 8**). En concordancia con datos biofísicos previos [58–60,85], la región de bOBP<sub>121G+</sub> correspondiente a la región del intercambio de dominio no hizo un contacto estable con el barril- $\beta$ , fluctuando constantemente durante la simulación. De acuerdo con los datos RMSD y RMSF, la conformación del barril- $\beta$  de apo bOBP<sub>121G+</sub> fue muy similar al de bOBP, aunque con un ligero incremento en la flexibilidad estructural (**Figura 14**). De manera similar al dímero, apo bOBP<sub>121G+</sub> tendió a secuestrar moléculas de agua dentro de su cavidad de unión. No obstante, el monómero alcanzó un valor promedio de  $\bar{N}_w$  ligeramente mayor

( $7.6 \pm 2.9$ ) en un menor tiempo (60 ns) que el dímero. Además,  $N_w$  mostró una mayor dispersión en el monómero (2 a 14) que en el dímero (5 a 9). En general, todos estos parámetros indican una dinámica ligeramente mayor de bOBP<sub>121G+</sub> en relación con bOBP respecto a la flexibilidad estructural y al intercambio de moléculas de agua. Las trayectorias obtenidas para bOBP<sub>121G+</sub> en complejo con HEX u OCT también revelaron perfiles de RMSD estables, con una estructura promedio muy similar al de las apoproteínas (**Figura 14A**). Ambos complejos mostraron valores globales de RMSD ligeramente mayores y un incremento en la fluctuación de los bucles B-C y D-E (**Figura 14B**). En presencia del ligando, la cavidad de unión fue menos propensa a incorporar moléculas de agua (**Figura 15**). HEX y OCT provocaron un decremento en  $\bar{N}_w$  de  $\sim 5$  y  $\sim 7$  respecto a las apoproteínas, respectivamente.

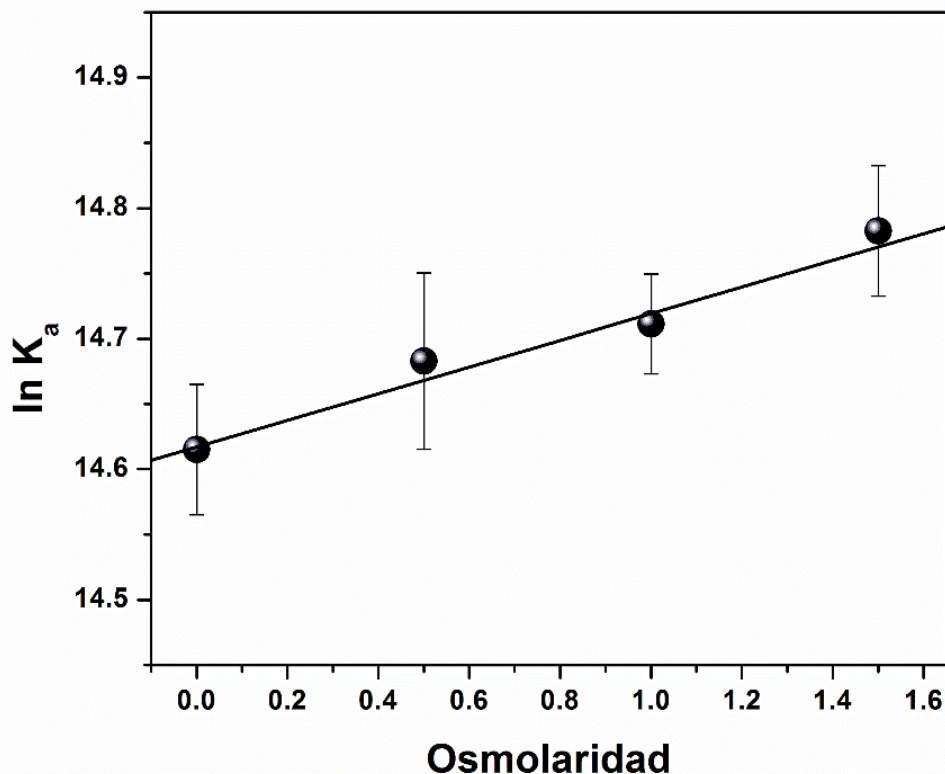
## 8.5 Evaluación experimental del intercambio de moléculas de agua

A través del método de estrés osmótico utilizando sacarosa como agente perturbante, se evaluaron experimentalmente los efectos de hidratación acoplados al reconocimiento de OCT por bOBP<sub>121G+</sub> [86,87]. Los osmolitos no iónicos reducen la actividad química del cúmulo de aguas en el seno acuoso. Por consiguiente, se espera que la presencia de un osmolito cause un incremento en la constante de afinidad en los eventos de asociación que expulsan moléculas de agua, mientras que el comportamiento contrario se esperaría de los eventos de asociación que secuestran moléculas de agua. El número de moléculas de agua intercambiado,  $\Delta N_w$ , se puede estimar de la dependencia de  $K_a$  con respecto a la osmolaridad de la solución [86]:

$$\Delta N_w = -55.6 \frac{\partial \ln K_a}{\partial \text{osmolaridad}}$$

Los resultados de MD determinaron un valor  $\Delta N_w$  relativamente pequeño. Por lo tanto, era de esperarse una pequeña dependencia de  $K_a$  de la osmolaridad de la solución. En consecuencia, se hicieron mediciones solo con OCT, el ligando que en principio desplazaría el mayor número de moléculas de agua. Como se muestra en la **Figura 16**,  $K_a$  aumentó progresivamente conforme se incrementaba la concentración del osmolito, consistente con la liberación neta de moléculas de agua tras la unión. Un análisis de regresión lineal de los datos produjo un  $\Delta N_w = -6 \pm 3$ , un valor que muestra buena concordancia con los valores determinados por simulaciones de MD ( $\sim -7$  moléculas de agua). También cabe observar que el error estándar asociado a la pendiente en la **Figura 16** es comparable a los observados en otros sistemas de proteínas caracterizados por la misma aproximación [87].





**Figura 16.** Mediciones de estrés osmótico.  $K_b$  para el complejo bOBP<sub>121G+</sub>-OCT fue determinada calorimétricamente como una función de la osmolaridad de sacarosa, pH 7.4, 37 °C.

## 8.6 Evaluación energética de las moléculas de agua

Se determinaron varias mediciones relacionadas con la hidratación dentro de la cavidad de unión de la proteína a partir de las trayectorias de MD. Los resultados se resumen en la **Tabla 4**. Como se mencionó anteriormente, bOBP y bOBP<sub>121G+</sub> sin ligando mostraron aproximadamente el mismo valor  $\bar{N}_w$ . Considerando el volumen promedio de la cavidad de unión ( $450 \pm 50 \text{ \AA}^3$ ), la densidad de las moléculas de agua alojadas dentro de las cavidades apo ( $\sim 16 \pm 6$  por  $1000 \text{ \AA}^3$ ) fue aproximadamente la mitad de la densidad experimental del agua líquida ( $33$  por  $1000 \text{ \AA}^3$ ). Notablemente, las moléculas de agua mostraron una movilidad considerable dentro de la cavidad de unión, con un RMSF promedio de  $3.5 \pm 0.1 \text{ \AA}$ . El volumen cubierto por cada molécula asumiendo una esfera con un radio igual a este valor de RMSF sería de  $\sim 120 \text{ \AA}^3$ , el cual es una fracción significativa del volumen total de la cavidad de unión (**Tabla 4**). De hecho, como se muestra en el mapa de densidad presentado en la Figura 17, no se observaron sitios preferenciales de hidratación en la cavidad de unión. La presencia del ligando disminuyó notablemente la densidad promedio de moléculas secuestradas. Por tal motivo, la cavidad de unión estuvo hidratada sub-óptimamente

en ausencia del ligando, y prácticamente deshidratada en presencia de OCT. Para evaluar las propiedades energéticas de las moléculas de agua sepultadas, se calcularon las energías no enlazantes siguiendo la aproximación usada por Young et al. [39]. También se calcularon las propiedades de las moléculas de agua en el seno acuoso. De acuerdo con los datos en la **Tabla 4**, las moléculas de agua en el seno acuoso tuvieron una energía potencial más negativa ( $E_{\text{pot}}$ ) y formaron un mayor número de puentes de hidrógeno ( $N_{\text{hb}}$ ) que las moléculas de agua dentro de la cavidad de unión. A su vez, las moléculas externas mostraron una energía electrostática ( $E_{\text{ele}}$ ) más favorable y una energía de van der Waals ( $E_{\text{vdw}}$ ) más desfavorable que las moléculas de agua internas. Con respecto a las moléculas de agua dentro de la cavidad, en tanto  $N_{\text{hb}}$  y  $\bar{N}_w$  decrecieron,  $E_{\text{pot}}$  y  $E_{\text{elec}}$  se volvieron menos favorables, mientras que  $E_{\text{vdw}}$  pasó de desfavorable a favorable. En general, la tendencia que muestra la **Tabla 4** indica que las moléculas de agua dentro de la cavidad muestran interacciones no-covalentes progresivamente más reducidas al disminuir la hidratación en la cavidad de unión. Por lo tanto, los datos sugieren que las nuevas interacciones formadas en el seno acuoso por las moléculas de agua expulsadas de la cavidad de la proteína contribuyen favorablemente a la entalpía global de unión.

**Tabla 4.** Hidratación residual dentro de la cavidad de unión determinada por MD<sup>a</sup>

	$\bar{N}_w$	$V^b$ ( $\text{\AA}^3$ )	$\rho_w$ ( $N_w/\text{\AA}^3 \times 10^{-3}$ )	$N_{\text{hb}}$	$E_{\text{pot}}$ ( $\text{kcal mol}^{-1}$ )	$E_e$ ( $\text{kcal mol}^{-1}$ )	$E_{\text{vdw}}$ ( $\text{kcal mol}^{-1}$ )
<b>H<sub>2</sub>O (seno acuoso)</b>	--	--	33 <sup>c</sup>	3.5±0.9	-19.6±0.2	-22.4±0.2	2.8±0.1
<b>bOBP</b>	6.9±1.0	462±63	14.9±2.1	2.3±0.9	-16.0±0.4	-16.8±0.4	0.8±0.2
<b>bOBP<sub>121G+</sub></b>	7.6±2.9	447±50	17.0±6.5	2.5±0.9	-16.8±0.2	-17.6±0.2	1.0±0.2
<b>bOBP<sub>121G+</sub>-HEX</b>	2.3±0.4	422±69	5.5± 2.1	2.1±0.6	-15.6±0.1	-15.2±0.4	-0.4±0.4
<b>bOBP<sub>121G+</sub>-OCT<sup>d</sup></b>	0.2±0.5	430±41	0.5±0.1	1.4±1.0	-10.0±1.8	-8.2±2.3	-1.8±0.2

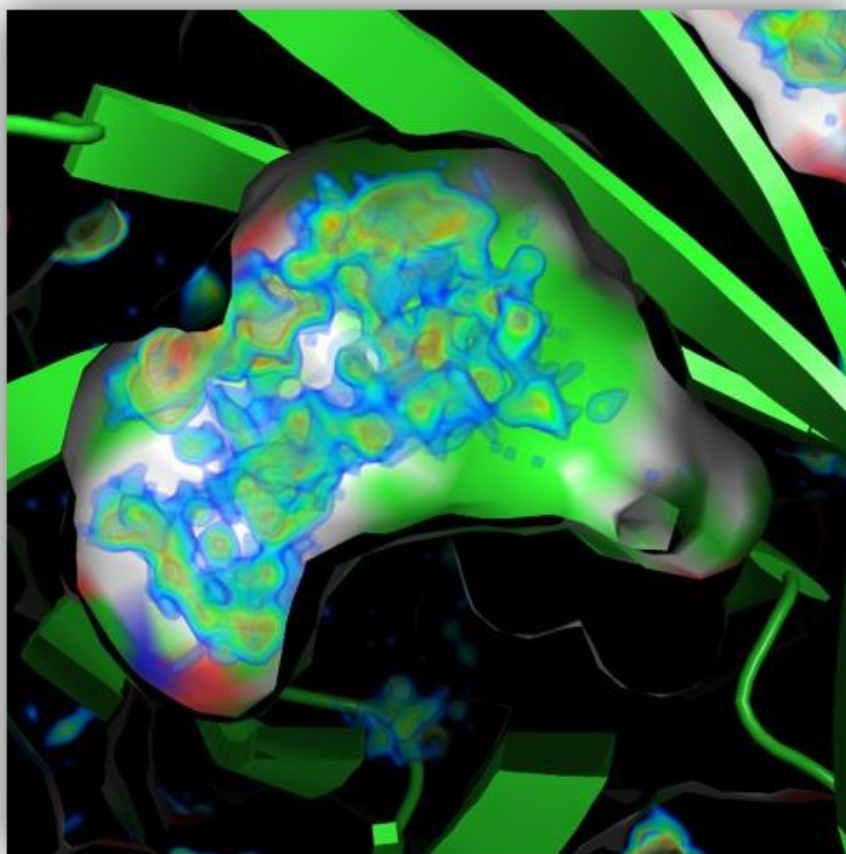
<sup>a</sup> Los valores de energía corresponden a las así llamadas “energías mundiales” [39], la cual son la diferencia en energía del sistema de simulación con y sin el número indicado de moléculas de agua dentro de la cavidad de unión. Las energías para un valor dado de  $N_w$  fueron calculados como el promedio ponderado de las propiedades de un cúmulo de segmentos de trayectoria correspondientes a tres valores  $N_w$  alrededor del valor promedio (por ejemplo, las propiedades para los segmentos de trayectoria con  $N_w = 6, 7, 8$  fueron promediados ponderadamente para obtener las propiedades de bOBP).

<sup>b</sup> Volumen promedio de la cavidad de unión durante la simulación de MD. En el caso del complejo proteína-ligando, el volumen del ligando (HEX: 115±3  $\text{\AA}^3$ , OCT: 149±3  $\text{\AA}^3$ ) fue restado del volumen total de la cavidad de unión.

<sup>c</sup> Densidad experimental del agua líquida.

<sup>d</sup> En promedio, OCT desplazó virtualmente todas las moléculas de agua de la cavidad de unión. Para propósitos de comparación, son presentados los valores de  $N_{\text{hb}}$  y de energía exhibidos por una sola molécula de agua dentro de la cavidad de unión ocupada por OCT.



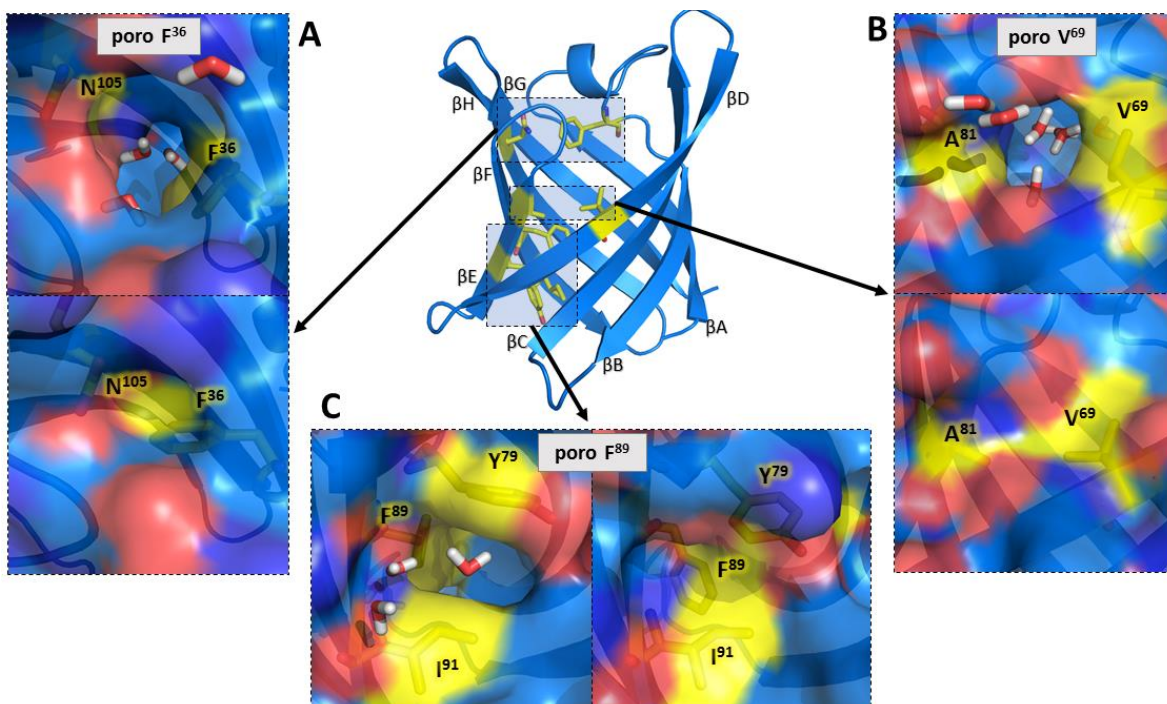


**Figura 17.** Mapa de densidad de agua en la cavidad de unión sin ligando de bOBP. La densidad se calculó con la suite del programa pyMDMIX [74], y se representó con el programa PYMOL [79]. La rampa de color va de azul marino para la densidad más baja a través de azul cielo, verde, amarillo y finalmente rojo para la densidad más alta.

## 8.7 Intercambio de moléculas de agua a través de poros transitorios

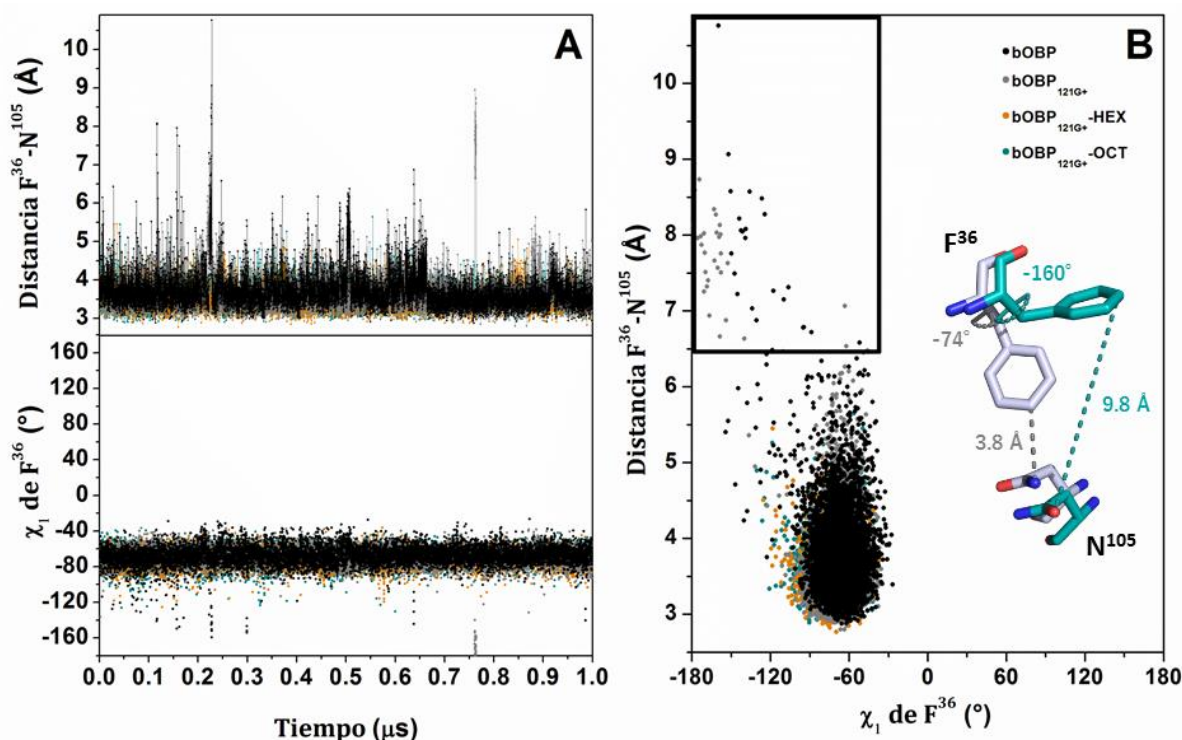
Una inspección visual de las trayectorias reveló que el intercambio de moléculas de agua entre la cavidad de unión y el disolvente del entorno fue un proceso dinámico que ocurrió a través de varios poros transitorios (**Figura 18**). Algunas lipocalinas, tal como la proteína de unión a retinol o la  $\beta$ -lactoglobulina (**Figura 3**), muestran una apertura en la parte superior del barril- $\beta$ , la cual claramente funciona como entrada o “boca” de la cavidad de unión [88–90]. En contraste, la cavidad de unión aparece completamente inaccesible al disolvente en todas las estructuras cristalográficas de bOBP. La **Figura 18** ilustra los tres poros de la proteína observados durante la simulación, a través de los cuales las moléculas del disolvente cruzaron hacia adentro y hacia afuera de la cavidad de unión. Dos de ellos se localizaron cerca

de la parte superior del barril- $\beta$ , mientras que el otro se observó en el fondo de la cavidad de unión.



**Figura 18.** Representación esquemática de los tres poros en la superficie del barril- $\beta$  que se abren espontáneamente para permitir el tránsito de moléculas de agua de ida y vuelta a la cavidad de unión durante la simulación por DM. Las aperturas de los dos poros en la parte superior del barril- $\beta$ , poro<sup>F36</sup> (A) y poro<sup>V69</sup> (B), dependieron principalmente de la rotación de la cadena lateral de un residuo, F<sup>36</sup> y V<sup>69</sup>, respectivamente, mientras que la apertura del poro del fondo de la cavidad de unión, poro<sup>F89</sup> (C), dependió de la apertura simultánea de dos capas definidas por los residuos F<sup>89</sup>-Y<sup>79</sup> e I<sup>91</sup>-Y<sup>79</sup>. Las capturas de trayectoria son presentadas para cada poro en su conformación abierta y cerrada.

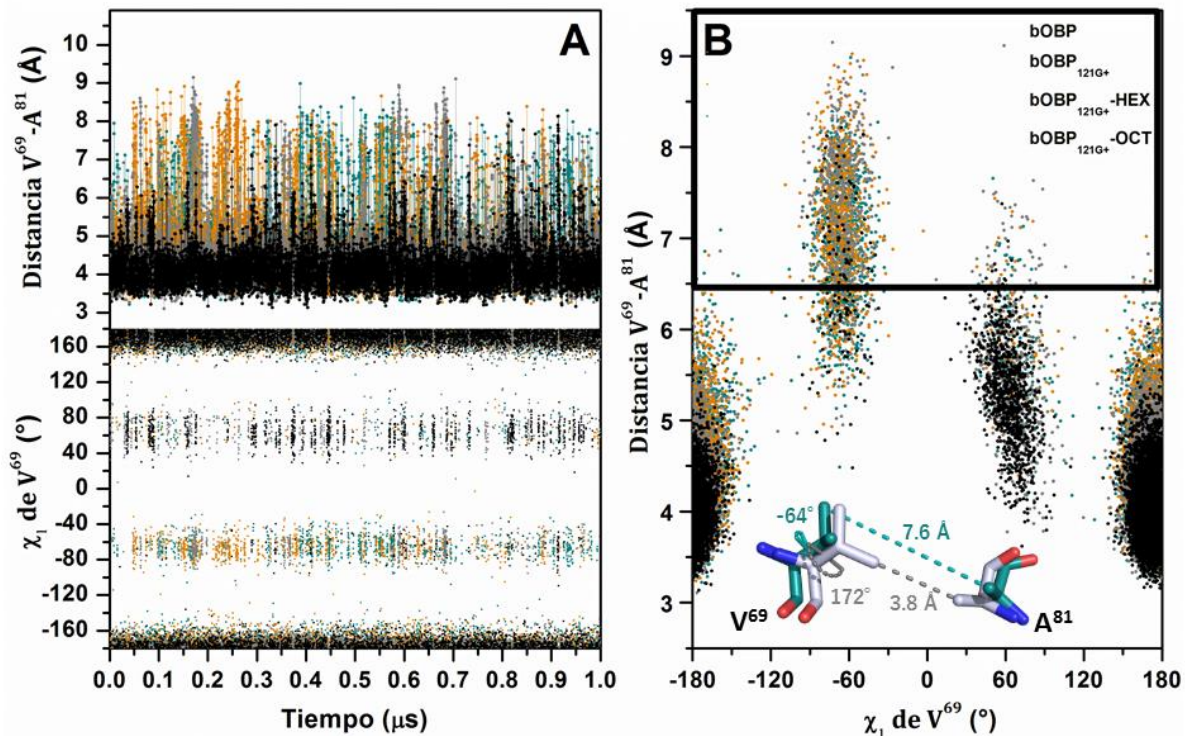
La apertura de uno de los poros de la parte superior de la proteína, poro<sup>F36</sup>, correlacionó con la rotación de la cadena lateral de F<sup>36</sup>, un residuo localizado en el bucle A-B (Figura 18A). En todas las estructuras cristalográficas de bOBP, F<sup>36</sup> muestra una conformación definida por un ángulo diedro  $\chi_1$  de  $\sim -75^\circ$ . F<sup>36</sup> mantuvo ese ángulo durante el mayor tiempo de la simulación (Figura 19). Con esta conformación el anillo aromático de F<sup>36</sup> se mantuvo cercano a la cadena lateral de N<sup>105</sup>, ocluyendo el poro. En ambas apoproteínas, la rotación esporádica en dirección  $\chi_1 = -180^\circ$  movió a F<sup>36</sup> lejos de N<sup>105</sup>, dando lugar a la apertura del poro, y permitiendo el tránsito de las moléculas del disolvente. El poro<sup>F36</sup> se observó en la conformación abierta 7 y 4 veces en bOBP y bOBP<sub>121G+</sub>, respectivamente, mientras que no se presentaron eventos de apertura en presencia de cualquiera de los dos ligandos (Figura 19).



**Figura 19.** Actividad de apertura del poro<sup>F36</sup>. **A)** Distancia entre el átomo Cζ de F<sup>36</sup> y Nδ2 de N<sup>105</sup> (superior) y el ángulo diedro  $\chi_1$  de F<sup>36</sup> (inferior) a lo largo de la DM. **B)** Distancia F<sup>36</sup>-N<sup>105</sup> como una función del ángulo  $\chi_1$  de F<sup>36</sup>. Los conformeros abierto y cerrado son esquematizados como barras azules y grises, respectivamente. El rectángulo delimita la región donde el poro se abrió. El tránsito de moléculas de agua a través del poro se observó a una distancia > 6.5 Å entre F<sup>36</sup>-N<sup>105</sup>.

La apertura del otro poro transitorio en la parte superior del barril beta, poro<sup>V69</sup>, también obedeció en gran parte a la conformación de un solo residuo, V<sup>69</sup>, localizado en el centro de la hebra-β D (**Figura 18B**). En las estructuras cristalográficas de bOBP, la cadena lateral de V<sup>69</sup> muestra una conformación constante con  $\chi_1 \sim +170^\circ$ , contactando el grupo metilo de A<sup>81</sup>, localizado al final de la hebra-β E. La rotación de V<sup>69</sup> a  $\chi_1 \sim -70^\circ$ , provocó la apertura del poro<sup>V69</sup> (**Figura 20**). V<sup>69</sup> pobló un tercer conformero con  $\chi_1 \sim +70^\circ$ , en el cual el poro estuvo mayormente ocluido. Las transiciones abierto/cerrado del poro<sup>V69</sup> fueron mucho más frecuentes que las del poro<sup>F36</sup>, y esta frecuencia se incrementó incluso más en presencia de los ligandos. Por consiguiente, pareció factible tomar las fracciones de tiempo acumulado de conformeros abiertos y cerrados como una medida de los correspondientes pesos estadísticos. Las fracciones de tiempo de las simulaciones ( $f_t$ ) con poro<sup>V69</sup> en el estado abierto fueron 0.008, 0.051, 0.080 y 0.078 para bOBP, bOBP<sub>121G+</sub>, bOBP<sub>121G+</sub>-HEX, bOBP<sub>121G+</sub>-OCT, respectivamente. En consecuencia, los correspondientes valores (endergónicos) de  $\Delta G$  para la apertura del poro fueron 3.0, 1.8, 1.6, y 1.6 kcal mol<sup>-1</sup>.

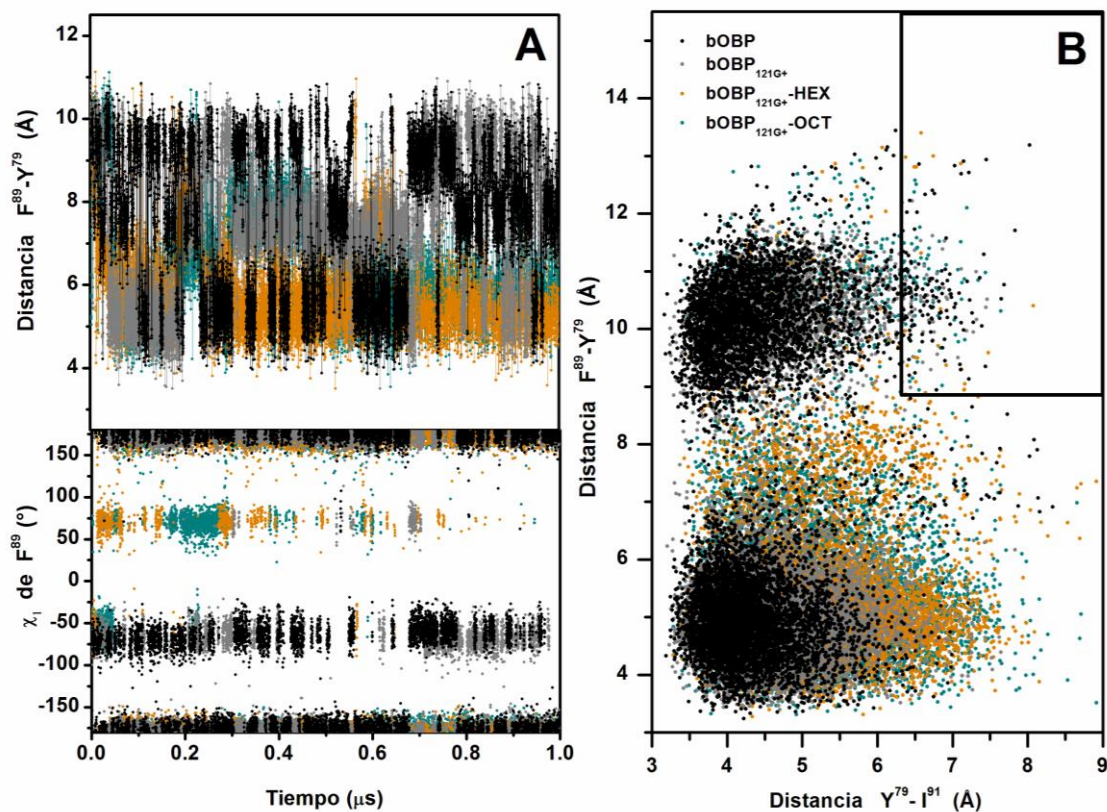




**Figura 20.** Actividad de apertura del poro<sup>V69</sup>. **A)** Distancia entre el átomo C $\gamma$ 1 de V<sup>69</sup> y C $\beta$  de A<sup>81</sup> (superior) y el ángulo diedro  $\chi_1$  de V<sup>69</sup> (fondo). **B)** Distancia V<sup>69</sup>-A<sup>81</sup> como una función del ángulo  $\chi_1$  de V<sup>69</sup>. El rectángulo delimita la región en la cual el poro<sup>V69</sup> abrió. El tránsito de moléculas de agua a través del poro se observó a una distancia > 6.5 Å entre V<sup>69</sup>-A<sup>81</sup>.

El poro más grande detectado en la simulación, poro<sup>F89</sup>, se observó en el fondo de la cavidad de unión (**Figura 18C**). La apertura de este poro ocurrió cuando una capa interna y una externa abrieron simultáneamente. La capa interna estaba formada por F<sup>89</sup> (en la mitad de la hebra- $\beta$  F) y Y<sup>79</sup> (en la mitad de la hebra- $\beta$  E). F<sup>89</sup> es un residuo que ha sido resuelto en dos diferentes conformaciones en la estructura cristalográfica bOBP [18,61]. Con un valor  $\chi_1$  de  $\sim \pm 180^\circ$ , el anillo aromático de F<sup>89</sup> divide a la cavidad de unión en una cavidad grande y otra pequeña, esta última con un tamaño aproximado a una molécula de agua [56]. Con un valor  $\chi_1$  de  $\sim +70^\circ$  se forma una sola cavidad [18]. Durante todas las simulaciones, el conformero  $\chi_1 \sim \pm 180^\circ$  fue el más visitado (**Figura 21**), con  $f_t \sim 0.6-0.7$  en las apoproteínas y  $\sim 0.7-0.8$  en los dos complejos. El conformero con  $\chi_1 \sim +70^\circ$  también fue visitado, aunque más frecuentemente en los dos complejos con ligando ( $f_t \sim 0.1$ ) que en las apoproteínas ( $f_t < 0.03$ ). El segundo conformero más visitado en las formas apo fue  $\chi_1 \sim -70^\circ$  ( $f_t \sim 0.3-0.4$ ), mientras que en los dos complejos fue mucho menos visitado ( $f_t < 0.05$ ). Este último conformero, no observado en ninguna de las estructuras cristalográficas de bOBP, separa las cadenas laterales de F<sup>89</sup> y Y<sup>79</sup>, abriendo la capa interna del poro<sup>F89</sup>.

No obstante, el tránsito de moléculas de agua desde y hacia la cavidad de unión ocurrió solo cuando la capa externa, formada por I<sup>91</sup> (en el centro de la hebra- $\beta$  S) y Y<sup>79</sup>, estuvo simultáneamente abierta. La distancia de estos residuos se determinó por diferentes reordenamientos de sus partes de cadena lateral y principal, sin mostrar una clara correlación con algún ángulo diedro. Como la actividad de apertura de esta capa fue mucho más limitada ( $f_t < 0.01$ ) que la capa interna, representó el cuello de botella para la completa apertura del poro<sup>F89</sup>. La actividad de la capa externa fue escasamente modificada por la presencia de un ligando (**Figura 21B**).

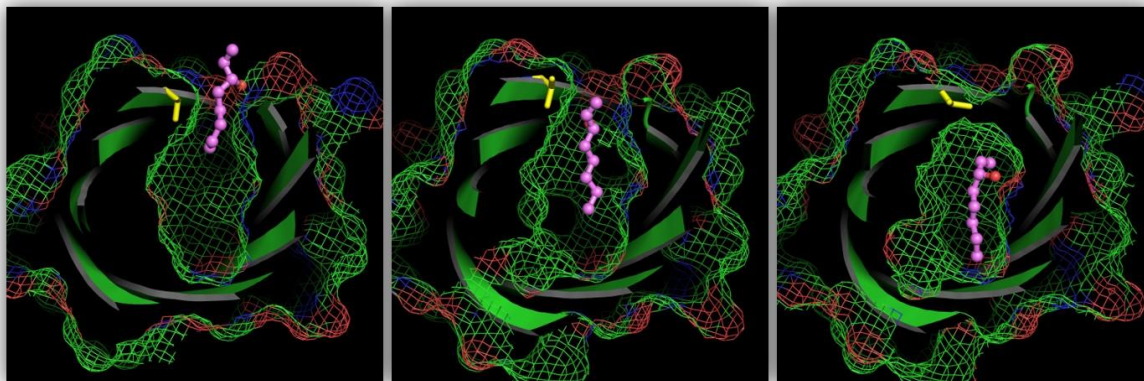


**Figura 21.** Actividad de apertura del poro<sup>F89</sup>. **A)** Cronología de la distancia entre el átomo C $\zeta$  de F<sup>89</sup> y el C $\gamma$ 1 de Y<sup>79</sup> (superior) y el ángulo diedro  $\chi_1$  de F<sup>89</sup> (Fondo). **B)** Distancia F<sup>89</sup>-Y<sup>79</sup> como una función de la distancia I<sup>91</sup>(C $\delta$ 1)-Y<sup>79</sup>(C $\epsilon$ 1). El rectángulo delimita la región en la cual el poro<sup>F89</sup> estuvo abierto. El tránsito de moléculas de agua a través del poro se observó a distancias  $> 8.5$  y  $6.5$  Å entre F<sup>89</sup>-Y<sup>79</sup> e I<sup>91</sup>-Y<sup>79</sup>, respectivamente.

En las formas apo de bOBP y bOBP<sub>121G+</sub>, virtualmente todos los eventos de apertura de los tres poros ocurrieron acoplados al tránsito de moléculas de agua. La presencia de ligando en la cavidad de unión provocó efectos claramente diferentes en la actividad de apertura e intercambio de moléculas de agua en cada poro. El poro<sup>F36</sup> se vio en su conformación abierta 7 y 4 veces en apo bOBP y bOBP<sub>121G+</sub>, respectivamente, mientras no se observaron eventos de apertura en presencia de cualquier ligando. Esta disminución en la dinámica de F<sup>36</sup> inducida por el ligando,

concuera con la ya observada en una simulación de 20 ns de la triple mutante bOBP<sub>GCC</sub> [91]. El poro<sup>F89</sup> se abrió 7-8 veces en la forma apo bOBP y en ambos complejos bOBP<sub>121G+</sub>, y 16 veces en apo bOBP<sub>121G+</sub>. El poro<sup>V69</sup>, el poro más activo, experimentó 26 y 116 eventos de apertura en apo bOBP y bOBP<sub>121G+</sub>, respectivamente. La presencia de un ligando provocó un incremento del ~ 60% en la frecuencia de apertura del poro<sup>V69</sup>. No obstante, una inspección visual de la trayectoria reveló que el ligando evitó el tránsito de moléculas de agua en el ~ 90% de los eventos de apertura.

Presumiblemente, los poros temporales pueden actuar como vías de acceso del ligando hacia la cavidad de unión. Para explorar si cualquiera de los poros puede actuar como vía de acceso para la entrada del ligando a la cavidad de unión, HEX y OCT se posicionaron mediante la técnica de acoplamiento molecular (Docking) contra una zona de la proteína restringida a la vecindad de cada poro en una conformación abierta. Los acoplamientos moleculares se corrieron permitiendo la flexibilidad conformacional del ligando utilizando el programa AutoDock Vina [78]. La mayoría de las poses del ligando en los tres poros mostraron al grupo hidroxilo expuesto al disolvente y la cadena alifática apuntando hacia el interior de la proteína. Las mejores poses para cada ligando en cada poro se sometieron a una serie de 10 simulaciones independientes y sin restricciones. Un ejemplo del proceso de inmersión del OCT dentro de la cavidad de unión se ilustra en la **Figura 22**. En todas las corridas para el poro<sup>F36</sup>, OCT y HEX entraron a la cavidad de unión en los primeros nanosegundos de simulación. El mismo resultado se observó para el OCT en el poro<sup>F89</sup>, mientras que el HEX logró ingresar al interior de la proteína en cuatro corridas y se alejó hacia el seno acuoso en los otros seis intentos. Es importante mencionar que la entrada del ligando causó una perturbación transitoria de la estructura secundaria local alrededor de cada poro. Esta observación es similar a lo observado en simulaciones por MD de disociación y asociación de ligandos realizadas con OBP porcino (pOBP) y OBP de rata variante 1F (rOBP-1F), donde el ligando atraviesa provocando una deformación reversible de las hebras- $\beta$  y los bucles que están en la parte superior del barril- $\beta$  [92–94].



**Figura 22.** Docking de OCT (esferas y barras) contra bOBP seguido por simulación por MD en disolvente explícito. Las imágenes ilustran el proceso de inmersión de OCT dentro de la cavidad de unión a través del poro<sup>V69</sup>. El residuo V<sup>69</sup> se representa con barras amarillas. La estructura inicial se generó por acoplamiento molecular de OCT contra el poro<sup>V69</sup> en una conformación abierta, usando el programa AutoDock Vina [78]. El complejo resultante se sometió a una simulación de MD sin restricciones en disolvente explícito. Dentro de los primeros ns de simulación, el ligando OCT entró completamente en la cavidad de unión, después de lo cual el poro<sup>V69</sup> se cerró espontáneamente.

## 9 Discusión

A diferencia de otras proteínas extracelulares pequeñas, las lipocalinas carecen de un núcleo hidrofóbico compacto [1]. En su lugar, en el centro del barril  $\beta$  presentan una gran cavidad hidrofóbica que funciona como el sitio de unión primario para moléculas hidrofóbicas. Esta arquitectura particular del sitio de unión ha resultado un desafío considerable en el objetivo de resolver las contribuciones puntuales que las diversas interacciones moleculares aportan para establecer la afinidad por ligandos. Acercamientos computacionales basados en modelos de solvatación implícita no han sido capaces de dar cuenta ni del valor absoluto ni de los cambios relativos para la interacción de lipocalinas con ligandos de diferente tamaño o naturaleza química [95,96].

A pesar de que el cáliz se encuentra altamente conservado entre los diversos miembros de la familia, las lipocalinas divergen notablemente en estructura primaria, especificidad de ligando, modo de unión y función biológica [1,3,97]. A lo largo de la evolución, estos factores pudieron haber resultado en estrategias diversificadas para modular la afinidad y especificidad de unión al ligando. En este contexto, encontramos instructivo comparar las firmas termodinámicas de unión de bOBP con las reportadas previamente para mMUP-I y rOBP3. A pesar de la baja identidad de secuencia ( $\sim 35\%$  en promedio), las tres lipocalinas presentan estructuras 3D muy similares, sus cavidades de unión están completamente ocultas al disolvente, además de presentar un efecto hidrofóbico no-clásico en la interacción con sus ligandos. Sin embargo, una



comparación de los parámetros de unión como función de la longitud del ligando reveló comportamientos inesperadamente diferentes. Mientras que la entalpía y entropía de unión de bOBP y mMUP-I decrecen con cada grupo metileno de ligando adicional (es decir, muestran una firma hidrofóbica no-clásica *específica*), lo opuesto se observa para rOBP3 (es decir, muestra una firma hidrofóbica clásica *específica*). Además, bOBP presenta valores de  $\Delta H_{CH_2}$  y  $T\Delta S_{CH_2}$  más negativos que los de mMUP-I. En cuanto a  $\Delta C_p_{CH_2}$ , bOBP tiene un valor casi nulo, mientras que mMUP-I exhibe un valor negativo que corresponde al esperado para la desolvatación de un grupo metileno formando parte de un compuesto orgánico simple.

Desafortunadamente, a partir de los datos disponibles hasta el momento no es posible determinar las bases de los diferentes comportamientos de unión mostrados por bOBP, mMUP-I y rOBP3. Diversos factores, ya sea de manera individual o en una combinación de ellos, podrían ser responsables de tales diferencias. Por ejemplo, se sabe que la formación de un puente de hidrógeno en una cavidad altamente hidrofóbica puede conducir a un cambio de entalpía muy favorable [98]. No obstante, en la estructura cristalográfica de bOBP no se observa que el ligando OCT forme algún puente de hidrógeno [61], característica que se reprodujo en las simulaciones de MD que realizamos para los complejos con HEX y OCT. Por otro lado, aún no está claro hasta qué grado el orden, la abundancia y el régimen de intercambio de moléculas de agua dentro de la cavidad de unión varía entre las lipocalinas. En el caso de mMUP-I, se ha descartado que la desolvatación de la cavidad contribuya de manera significativa a la entalpía global de unión [40,99]. Análogamente, mediciones de dispersión de relajación magnética de agua marcada con  $^{17}O$  y  $^2H$  han mostrado que la cavidad de b $\beta$ lg en ausencia de ligando, a pesar de estar abierta y por consiguiente accesible al disolvente, está esencialmente deshidratada [44].

Para racionalizar el efecto hidrofóbico no clásico en diversos complejos proteína-ligando y sistemas modelo, se ha propuesto que la desolvatación de la cavidad contribuye significativamente a la entalpía de unión del ligando [34,38–40,44,100–102]. De acuerdo con esta línea de argumentación, las moléculas de agua en el interior de la cavidad hidrofóbica, debido a la deficiente solvatación local, poseen una entalpía elevada, por lo que su liberación y regreso al seno acuoso debido a la unión de ligando produce una entalpía sustancialmente favorable a la entalpía global de unión. Un argumento similar se ha sugerido para explicar la unión de ligando entálpicamente guiada por parte de rOBP3; sin embargo, no se han caracterizado la solvatación interna de esta lipocalina, ni la dependencia de la unión con el tamaño del ligando,[34]. Los resultados de MD obtenidos en el presente estudio revelan que bOBP experimenta, aunque deficientemente, una significativa solvatación interna en su cavidad de unión. Esta solvatación está gobernada por una activa comunicación bidireccional entre la cavidad de unión y el disolvente circundante, la cual ocurre a través de tres poros que se abren transitoriamente en la escala de tiempo de nanosegundos. Las moléculas de agua internas de bOBP poseen una alta movilidad,



mostrando una deficiente satisfacción de su capacidad para formar puentes de hidrógeno y, por tanto, una energía potencial mayor con respecto a las moléculas de agua en el seno acuoso. Es decir, las propiedades energéticas de las aguas dentro de la cavidad de bOBP deberían situarse en algún punto intermedio entre las propiedades del agua líquida y la gaseosa [101,103]. La condensación del agua pura está acompañada por un gran cambio negativo de entalpía y entropía, así como por un incremento en la capacidad calorífica. Por lo tanto, el desplazamiento adicional de moléculas de agua provocado por OCT en relación con HEX podría contribuir significativamente a los valores distintivos de  $\Delta X_{CH_2}$  exhibidos por bOBP en comparación a los exhibidos por mMUP-I o rOBP3. Para probar con más detalle esta hipótesis proponemos que es necesario realizar una investigación computacional exhaustiva de las propiedades de solvatación de la cavidad de diversas lipocalinas.

Dado que en las diversas estructuras cristalográficas resueltas a la fecha la cavidad de bOBP aparece completamente cerrada al disolvente, aún sigue sin esclarecerse la zona de la proteína que funciona como entrada para dar acceso o salida de los ligandos. En un estudio de MD realizado con un solo protómero de bOBP a 53 °C, se reportó la apertura espontánea del barril- $\beta$  de bOBP acoplada a la rotación de F<sup>36</sup> y Y<sup>83</sup>[58]. Posteriormente, se observó la rotación de estos residuos en una simulación de la triple mutante bOBP<sub>GCC</sub> [91]. De manera similar, nosotros observamos la apertura espontánea de la cavidad dependiente de la rotación de F<sup>36</sup>. Sin embargo, a diferencia de esos reportes, nosotros no observamos cambios conformacionales de Y<sup>83</sup> en ninguna de las trayectorias. En el caso de pOBP y rOBP-1F, se ha detectado la exposición espontánea de la cavidad de unión al disolvente a través de la ruptura transitoria de la red de puentes de hidrógeno entre las hebras  $\beta$  D y E [92], y en el caso de pOBP a través de la rotación de Y<sup>82</sup> [104]. Sin embargo, ninguno de estos estudios *in silico* reportaron el tránsito de moléculas de agua hacia o desde el interior de la lipocalina. No está claro si la ausencia de solvatación interna en esas lipocalinas se debió al hecho de que son menos propensas que bOBP a secuestrar moléculas de agua dentro de la cavidad de unión, o simplemente a causa de que se muestreó un tiempo de simulación muy corto ( $\leq 20$  ns). Hasta donde es de nuestro conocimiento, para ninguna OBP se había reportado que los residuos V<sup>69</sup> y/o F<sup>89</sup> sufrieran rearrreglos conformacionales que permitieran el tránsito espontáneo de moléculas de agua. Respecto a la ruta de entrada del ligando, los experimentos de acoplamiento molecular seguidos por simulaciones de MD mostraron que cualquiera de los tres poros puede permitir el tránsito de ligandos hacia el interior de la cavidad de unión de bOBP. No obstante, cabe señalar que el poro<sup>F36</sup> fue el más propenso a permitir la entrada del ligando. En concordancia con este resultado, estudios de MD sesgada de pOBP y rOBP1F sugieren que la asociación/disociación del ligando puede ocurrir a través de una ruta que involucra una región cercana a F<sup>36</sup> y Y<sup>83</sup> (F<sup>35</sup>/Y<sup>82</sup>, numeración en pOBP) [92–94,104].

A pesar del número creciente de lipocalinas que se conocen con capacidad para formar homo-oligómeros [87,105–111], el efecto del estado cuaternario sobre la unión del ligando y la función biológica se han estudiado escasamente en esta familia [96,107,108,112–114]. bOBP es la única lipocalina conocida que se auto-asocia a través de un mecanismo de intercambio de dominio formando homodímeros [115–118]. Por lo tanto, decidimos realizar un estudio comparativo de esta lipocalina y su mutante monomérica con el fin de evaluar la posible relación entre la unión del ligando y la comunicación entre las subunidades. Las mediciones calorimétricas revelaron, sin embargo, que bOBP y bOBP<sub>121G+</sub> comparten las mismas propiedades, tanto al equilibrio como cinéticas, de unión al ligando. Además, las dos proteínas poseen la misma conformación de barril  $\beta$ , la cual a su vez presenta propiedades similares de hidratación en la cavidad hidrofóbica. La independencia entre las subunidades también se manifestó en la alta termoestabilidad de bOBP<sub>121G+</sub>. Por tanto, nuestras determinaciones establecieron que no existe, al menos dentro de la resolución de las técnicas utilizadas, comunicación alguna entre las dos subunidades de bOBP para interactuar con el ligando, ni para estabilizar la conformación funcional a temperatura fisiológica.

No obstante, la dimerización provoca un aumento modesto en la estabilidad térmica de las subunidades de bOBP a alta temperatura. Este incremento es consistente con la resistencia ligeramente aumentada que presenta bOBP a agentes caotrópicos en relación con la exhibida por bOBP<sub>121G+</sub> [85]. En este contexto, es interesante mencionar que no es inusual que dímeros silvestres que presentan un mecanismo de intercambio de dominio exhiban constantes de disociación en el rango de micromolar a milimolar, y que, a su vez, la interconversión entre monómeros y dímeros sea un proceso relativamente lento [118,119]. Es decir, recurrentemente se ha observado que el intercambio de dominios conlleva a una estabilización de tipo cinético. Por otro lado, diversos estudios de ingeniería de proteínas han mostrado que el intercambio de dominios se puede lograr o eliminar a través de cambios relativamente menores en la longitud del bucle bisagra [118,119]. De manera similar, nuestros datos, tomados en conjunto con otros resultados ya publicados [59,60,67], indican que el intercambio de dominios en bOBP no modifica notablemente la estabilidad estructural del barril  $\beta$ , sino que crea una barrera cinética grande que separa las subunidades monoméricas y diméricas inherentemente estables. Si esta propiedad representa o no una ventaja para la función *in vivo* de bOBP es una cuestión que aún está por ser esclarecida.

## 10 Conclusiones

A causa de la enorme variabilidad de la estructura primaria de las lipocalinas, no es sorprendente encontrar entre ellas diferentes estrategias energéticas para lograr la afinidad y selectividad por sus ligandos naturales. Al igual que otras lipocalinas, bOBP presenta un efecto hidrofóbico no clásico en la interacción con sus ligandos. Para miembros de otra familia de proteínas se ha propuesto que la expulsión de moléculas de agua de alta energía de la cavidad de unión hacia el seno acuoso contribuye considerablemente al cambio de entalpía que dirige el reconocimiento de ligandos hidrofóbicos [102]. En el caso de bOBP, simulaciones de MD revelan que la cavidad de unión se encuentra parcialmente solvatada. El desplazamiento de moléculas de agua de la cavidad hidrofóbica inducido por el ligando es consistente con el hecho de que bOBP presenta propiedades energéticas distintivas con respecto a otras lipocalinas. La solvatación interna de bOBP se gobierna por un intercambio frecuente de moléculas de agua, que ocurre a través de diversos poros o túneles transitorios, una propiedad que, hasta donde sabemos, no ha sido documentada para alguna otra lipocalina. En general, nuestros resultados experimentales y computacionales aportan nueva información sobre la termodinámica y el mecanismo de unión de las lipocalinas, destacando el papel que juegan las moléculas de agua de la cavidad en el proceso de reconocimiento molecular.

## 11 REFERENCIAS

- [1] B. Akerstrom, D.R. Flower, J.P. Salier, Lipocalins: unity in diversity., *Biochim. Biophys. Acta.* 1482 (2000) 1–8. [https://doi.org/10.1016/s0167-4838\(00\)00137-0](https://doi.org/10.1016/s0167-4838(00)00137-0).
- [2] J. Grzyb, D. Latowski, K. Strzałka, Lipocalins - a family portrait, *J. Plant Physiol.* 163 (2006) 895–915. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.12.007>.
- [3] D.R. Flower, The lipocalin protein family: structure and function., *Biochem. J.* 318 (Pt 1) (1996) 1–14. <https://doi.org/10.1042/bj3180001>.
- [4] D.R. Flower, A.C.T. North, T.K. Attwood, Structure and sequence relationships in the lipocalins and related proteins, *Protein Sci.* 2 (1993) 753–761. <https://doi.org/10.1002/pro.5560020507>.
- [5] D.R. Flower, A.C.T. North, C.E. Sansom, The lipocalin protein family: Structural and sequence overview, *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1482 (2000) 9–24. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(00\)00148-5](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(00)00148-5).
- [6] M. Boudjelal, A. Sivaprasadarao, J.B.C. Findlay, Membrane receptor for odour-binding proteins, *Biochem. J.* 317 (1996) 23–27. <https://doi.org/10.1042/bj3170023>.
- [7] D. Lobel, Odorants of Different Chemical Classes Interact with Distinct Odorant Binding Protein Subtypes, *Chem. Senses.* 27 (2002) 39–44. <https://doi.org/10.1093/chemse/27.1.39>.
- [8] K.L. Portman, J. Long, S. Carr, L. Briand, D.J. Winzor, M.S. Searle, D.J. Scott, Enthalpy/entropy compensation effects from cavity desolvation underpin broad ligand binding selectivity for rat odorant binding protein 3, *Biochemistry.* 53 (2014) 2371–2379. <https://doi.org/10.1021/bi5002344>.
- [9] A.B.G. Veiga, J.M.C. Ribeiro, I.M.B. Francischetti, E. Xu, J.A. Guimarães, J.F. Andersen, Examination of the ligand-binding and enzymatic properties of a bilin-binding protein from the poisonous caterpillar *Ionomia obliqua*, *PLoS One.* 9 (2014). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095424>.
- [10] N.H. Rhys, M.C. Wang, T.A. Jowitt, J.R. Helliwell, J.G. Grossmann, C. Baldock, Deriving the ultrastructure of  $\alpha$ -crustacyanin using lower-resolution structural and biophysical methods, *J. Synchrotron Radiat.* 18 (2011) 79–83. <https://doi.org/10.1107/S0909049510034977>.
- [11] Y. Urade, O. Hayaishi, Biochemical, structural, genetic, physiological, and pathophysiological features of lipocalin-type prostaglandin D synthase., *Biochim. Biophys. Acta.* 1482 (2000) 259–71. [https://doi.org/10.1016/s0167-4838\(00\)00161-8](https://doi.org/10.1016/s0167-4838(00)00161-8).
- [12] D.A. Dartt, Tear lipocalin: Structure and function, *Ocul. Surf.* 9 (2011) 126–138.

[https://doi.org/10.1016/S1542-0124\(11\)70022-2](https://doi.org/10.1016/S1542-0124(11)70022-2).

- [13] G. Gotte, M. Libonati, Protein Oligomerization, in: *Oligomerization Chem. Biol. Compd.*, InTech, 2014. <https://doi.org/10.5772/57489>.
- [14] D.A. Breustedt, D.L. Schönfeld, A. Skerra, Comparative ligand-binding analysis of ten human lipocalins, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*. 1764 (2006) 161–173. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.12.006>.
- [15] D.R. Flower, The lipocalin protein family: A role in cell regulation, *FEBS Lett*. 354 (1994) 7–11. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)01078-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)01078-1).
- [16] M. Gottschalk, H. Nilsson, H. Roos, B. Halle, Protein self-association in solution: The bovine  $\beta$ -lactoglobulin dimer and octamer, *Protein Sci*. 12 (2009) 2404–2411. <https://doi.org/10.1110/ps.0305903>.
- [17] D.R. Flower, The lipocalin protein family: Structure and function, *Biochem. J*. 318 (1996) 1–14. <https://doi.org/10.1042/bj3180001>.
- [18] F. Vincent, R. Ramoni, S. Spinelli, S. Grolli, M. Tegoni, C. Cambillau, Crystal structures of bovine odorant-binding protein in complex with odorant molecules, *Eur. J. Biochem*. 271 (2004) 3832–3842. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04315.x>.
- [19] J.I. Loch, P. Bonarek, A. Polit, S. Świątek, M. Czub, M. Ludwikowska, K. Lewiński, Conformational variability of goat  $\beta$ -lactoglobulin: Crystallographic and thermodynamic studies, *Int. J. Biol. Macromol*. 72 (2015) 1283–1291. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.10.031>.
- [20] S. Xu, P. Venge, Lipocalins as biochemical markers of disease, *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol*. 1482 (2000) 298–307. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(00\)00163-1](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(00)00163-1).
- [21] S.Y. Xu, K. Pauksen, P. Venge, Serum measurements of human neutrophil lipocalin (HNL) discriminate between acute bacterial and viral infections, *Scand. J. Clin. Lab. Invest*. 55 (1995) 125–131. <https://doi.org/10.3109/00365519509089604>.
- [22] S. Schlehuber, A. Skerra, Lipocalins in drug discovery: From natural ligand-binding proteins to “anticalins,” *Drug Discov. Today*. 10 (2005) 23–33. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(04\)03294-5](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(04)03294-5).
- [23] A. Skerra, Alternative binding proteins: Anticalins - Harnessing the structural plasticity of the lipocalin ligand pocket to engineer novel binding activities, *FEBS J*. 275 (2008) 2677–2683. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06439.x>.
- [24] F. Bianchi, G. Basini, S. Grolli, V. Conti, F. Bianchi, F. Grasselli, M. Careri, R. Ramoni, An innovative bovine odorant binding protein-based filtering cartridge for the removal of triazine herbicides from water, *Anal. Bioanal. Chem*. 405 (2013) 1067–1075. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6499-0>.

- [25] A. Palla-Papavlu, A. Patrascioiu, F. Di Pietrantonio, J.M. Fernández-Pradas, D. Cannatà, M. Benetti, S. D’Auria, E. Verona, P. Serra, Preparation of surface acoustic wave odor sensors by laser-induced forward transfer, *Sensors Actuators, B Chem.* 192 (2014) 369–377. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.10.082>.
- [26] A.H. Sneharani, J. V. Karakkat, S.A. Singh, A.G.A. Rao, Interaction of curcumin with  $\beta$ -lactoglobulin; stability, spectroscopic analysis, and molecular modeling of the Complex, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 11130–11139. <https://doi.org/10.1021/jf102826q>.
- [27] A.O. Elzoghby, M.M. Elgohary, N.M. Kamel, Implications of Protein- and Peptide-Based Nanoparticles as Potential Vehicles for Anticancer Drugs, in: *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.*, Academic Press Inc., 2015: pp. 169–221. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2014.12.002>.
- [28] J. Gómez, V.J. Hilser, D. Xie, E. Freire, The heat capacity of proteins, *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 22 (1995) 404–412. <https://doi.org/10.1002/prot.340220410>.
- [29] P.W. Snyder, M.R. Lockett, D.T. Moustakas, G.M. Whitesides, Is it the shape of the cavity, or the shape of the water in the cavity?, *Eur. Phys. J. Spec. Top.* 223 (2014) 853–891. <https://doi.org/10.1140/epjst/e2013-01818-y>.
- [30] A.B.--I. Studies-Solids, L. and Gases, undefined 2011, Thermodynamics of ligand-protein interactions: implications for molecular design, Intechopen.Com. (n.d.). <https://www.intechopen.com/books/thermodynamics-interaction-studies-solids-liquids-and-gases/thermodynamics-of-ligand-protein-interactions-implications-for-molecular-design> (accessed December 28, 2019).
- [31] H.S. Frank, M.W. Evans, Free Volume and Entropy in Condensed Systems III. Entropy in Binary Liquid Mixtures; Partial Molal Entropy in Dilute Solutions; Structure and Thermodynamics in Aqueous Electrolytes, *J. Chem. Phys.* 13 (1945) 507–532. <https://doi.org/10.1063/1.1723985>.
- [32] C. Tanford, How protein chemists learned about the hydrophobic factor, *Protein Sci.* 6 (1997) 1358–1366. <https://doi.org/10.1002/pro.5560060627>.
- [33] J.D. Dunitz, The entropic cost of bound water in crystals and biomolecules, *Science* (80-. ). 264 (1994) 670. <https://doi.org/10.1126/science.264.5159.670>.
- [34] J. Seelig, P. Ganz, Nonclassical Hydrophobic Effect in Membrane Binding Equilibria, *Biochemistry.* 30 (1991) 9354–9359. <https://doi.org/10.1021/bi00102a031>.
- [35] P.W. Snyder, J. Mecinovic, D.T. Moustakas, S.W. Thomas, M. Harder, E.T. Mack, M.R. Lockett, A. Héroux, W. Sherman, G.M. Whitesides, Mechanism of the hydrophobic effect in the biomolecular recognition of arylsulfonamides by carbonic anhydrase., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (2011) 17889–94. <https://doi.org/10.1073/pnas.1114107108>.
- [36] M. Fernández-Vidal, S.H. White, A.S. Ladokhin, Membrane partitioning: “classical”

- and “nonclassical” hydrophobic effects, *J. Membr. Biol.* 239 (2011) 5–14. <https://doi.org/10.1007/s00232-010-9321-y>.
- [37] B.K. Paul, N. Ghosh, S. Mukherjee, Interaction of Bile Salts with  $\beta$ -Cyclodextrins Reveals Nonclassical Hydrophobic Effect and Enthalpy-Entropy Compensation, *J. Phys. Chem. B.* 120 (2016) 3963–3968. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b01385>.
- [38] B.J. Berne, J.D. Weeks, R. Zhou, Dewetting and Hydrophobic Interaction in Physical and Biological Systems, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 60 (2009) 85–103. <https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.58.032806.104445>.
- [39] T. Young, R. Abel, B. Kim, B.J. Berne, R.A. Friesner, Motifs for molecular recognition exploiting hydrophobic enclosure in protein-ligand binding, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 808–813. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610202104>.
- [40] S.W. Homans, Water, water everywhere — except where it matters?, *Drug Discov. Today.* 12 (2007) 534–539. <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2007.05.004>.
- [41] M. Gebauer, A. Skerra, Anticalins: Small engineered binding proteins based on the lipocalin scaffold, in: *Methods Enzymol.*, 2012: pp. 157–188. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396962-0.00007-0>.
- [42] J.M. Crowther, G.B. Jameson, R.C.J. Hodgkinson, Alison J. Dobson, Structure, Oligomerisation and Interactions of  $\beta$ -Lactoglobulin, in: I. Gigli (Ed.), *Milk Proteins - From Struct. to Biol. Prop. Heal. Asp.*, IntechOpen, 2016: pp. 33–50. <https://doi.org/10.5772/62992>.
- [43] S. Kume, Y.H. Lee, M. Nakatsuji, Y. Teraoka, K. Yamaguchi, Y. Goto, T. Inui, Fine-tuned broad binding capability of human lipocalin-type prostaglandin D synthase for various small lipophilic ligands, *FEBS Lett.* 588 (2014) 962–969. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.02.001>.
- [44] J. Qvist, M. Davidovic, D. Hamelberg, B. Halle, A dry ligand-binding cavity in a solvated protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 6296–6301. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709844105>.
- [45] N.R. Syme, C. Dennis, A. Bronowska, G.C. Paesen, S.W. Homans, Comparison of entropic contributions to binding in a “hydrophilic” versus “hydrophobic” ligand-protein interaction, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 8682–8689. <https://doi.org/10.1021/ja101362u>.
- [46] J.I. Loch, P. Bonarek, A. Polit, S. Świątek, M. Dziejicka-Wasylewska, K. Lewiński, The differences in binding 12-carbon aliphatic ligands by bovine  $\beta$ -lactoglobulin isoform A and B studied by isothermal titration calorimetry and X-ray crystallography, *J. Mol. Recognit.* 26 (2013) 357–367. <https://doi.org/10.1002/jmr.2280>.
- [47] J.I. Loch, P. Bonarek, A. Polit, M. Jabłoński, M. Czub, X. Ye, K. Lewiński,  $\beta$ -Lactoglobulin interactions with local anaesthetic drugs - Crystallographic and

- calorimetric studies, *Int. J. Biol. Macromol.* 80 (2015) 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.06.013>.
- [48] J.I. Loch, A. Polit, P. Bonarek, D. Olszewska, K. Kurpiewska, M. Dzedzicka-Wasylewska, K. Lewiński, Structural and thermodynamic studies of binding saturated fatty acids to bovine  $\beta$ -lactoglobulin, *Int. J. Biol. Macromol.* 50 (2012) 1095–1102. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.03.002>.
- [49] M. Rovoli, T. Thireou, Y. Choiset, T. Haertlé, L. Sawyer, E. Eliopoulos, G. Kontopidis, Thermodynamic, crystallographic and computational studies of non-mammalian fatty acid binding to bovine  $\beta$ -Lactoglobulin, *Int. J. Biol. Macromol.* 118 (2018) 296–303. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.226>.
- [50] R.J. Bingham, J.B.C. Findlay, S.Y. Hsieh, A.P. Kalverda, A. Kjellberg, C. Perazzolo, S.E.V. Phillips, K. Seshadri, C.H. Trinh, W.B. Turnbull, G. Bodenhausen, S.W. Homans, Thermodynamics of Binding of 2-Methoxy-3-isopropylpyrazine and 2-Methoxy-3-isobutylpyrazine to the Major Urinary Protein, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 1675–1681. <https://doi.org/10.1021/ja038461i>.
- [51] R. Malham, S. Johnstone, R.J. Bingham, E. Barratt, S.E. V. Phillips, C.A. Laughton, S.W. Homans, Strong Solute–Solute Dispersive Interactions in a Protein–Ligand Complex, (2005). <https://doi.org/10.1021/JA055454G>.
- [52] E. Barou, M. Sigoillot, M. Bouvet, L. Briand, R. Meunier-Prest, Electrochemical detection of the 2-isobutyl-3-methoxypyrazine model odorant based on odorant-binding proteins: The proof of concept, *Bioelectrochemistry.* 101 (2015) 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2014.06.006>.
- [53] D. Lobel, Identification of a Third Rat Odorant-binding Protein (OBP3), *Chem. Senses.* 26 (2001) 673–680. <https://doi.org/10.1093/chemse/26.6.673>.
- [54] M. V. Novotny, M.J. Stone, L. Zidek, Increased protein backbone conformational entropy upon hydrophobic ligand binding., *Nat. Struct. Biol.* 6 (1999) 1118–1121. <https://doi.org/10.1038/70057>.
- [55] E. Barratt, R.J. Bingham, D.J. Warner, C.A. Laughton, S.E. V. Phillips, S.W. Homans, Van der Waals Interactions Dominate Ligand–Protein Association in a Protein Binding Site Occluded from Solvent Water, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 11827–11834. <https://doi.org/10.1021/ja0527525>.
- [56] M. Tegoni, R. Ramoni, E. Bignetti, S. Spinelli, C. Cambillau, Domain swapping creates a third putative combining site in bovine odorant binding protein dimer, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 3 (1996) 863–867. <https://doi.org/10.1038/nsb1096-863>.
- [57] M.A. Bianchet, G. Bains, P. Pelosi, J. Pevsner, S.H. Snyder, H.L. Monaco, L.M. Amzel, The three-dimensional structure of bovine odorant binding protein and its mechanism of odor recognition., *Nat. Struct. Biol.* 3 (1996) 934–9.
- [58] A. Mazzini, E. Polverini, M. Parisi, R. Sorbi, R. Favilla, Dissociation and unfolding of



- bovine odorant binding protein at acidic pH, *J. Struct. Biol.* 159 (2007) 82–91. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2007.02.007>.
- [59] R. Ramoni, F. Vincent, A.E. Ashcroft, P. Accornero, S. Grolli, C. Valencia, M. Tegoni, C. Cambillau, Control of domain swapping in bovine odorant-binding protein, *Biochem. J.* 365 (2002) 739–748. <https://doi.org/10.1042/BJ20011631>.
- [60] R. Ramoni, S. Spinelli, S. Grolli, V. Conti, E. Merli, C. Cambillau, M. Tegoni, Deswapping bovine odorant binding protein, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics.* 1784 (2008) 651–657. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.01.010>.
- [61] R. Ramoni, F. Vincent, S. Grolli, V. Conti, C. Malosse, F.D. Boyer, P.N. Le Meillour, S. Spinelli, C. Cambillau, M. Tegoni, The Insect Attractant 1-Octen-3-ol is the Natural Ligand of Bovine Odorant-binding Protein, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 7150–7155. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010368200>.
- [62] W. Takken, D.L. Kline, Carbon dioxide and 1-octen-3-ol as mosquito attractants., *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 5 (1989) 311–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2573687> (accessed December 29, 2019).
- [63] F. Vincent, S. Spinelli, R. Ramoni, S. Grolli, P. Pelosi, C. Cambillau, M. Tegoni, Complexes of porcine odorant binding protein with odorant molecules belonging to different chemical classes, *J. Mol. Biol.* 300 (2000) 127–139. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3820>.
- [64] J. Vidic, J. Grosclaude, R. Monnerie, M.A. Persuy, K. Badonnel, C. Baly, M. Caillol, L. Briand, R. Salesse, E. Pajot-Augy, On a chip demonstration of a functional role for odorant binding protein in the preservation of olfactory receptor activity at high odorant concentration, *Lab Chip.* 8 (2008) 678–688. <https://doi.org/10.1039/b717724k>.
- [65] P. Pelosi, A.M. Pisanelli, N.E. Baldaccini, A. Gagliardo, Binding of [<sup>3</sup>H]-2-isobutyl-3-methoxypyrazine to cow olfactory mucosa, *Chem. Senses.* 6 (1981) 77–85. <https://doi.org/10.1093/chemse/6.2.77>.
- [66] J.M. Heydel, A. Coelho, N. Thiebaud, A. Legendre, A.M. Le Bon, P. Faure, F. Neiers, Y. Artur, J. Golebiowski, L. Briand, Odorant-binding proteins and xenobiotic metabolizing enzymes: Implications in olfactory perireceptor events, *Anat. Rec.* 296 (2013) 1333–1345. <https://doi.org/10.1002/ar.22735>.
- [67] A. Mazzini, A. Maia, M. Parisi, R.T. Sorbi, R. Ramoni, S. Grolli, R. Favilla, Reversible unfolding of bovine odorant binding protein induced by guanidinium hydrochloride at neutral pH., *Biochim. Biophys. Acta.* 1599 (2002) 90–101.
- [68] M.D.C. Portillo-Télliz, M. Bello, G. Salcedo, G. Gutiérrez, V. Gómez-Vidales, E. García-Hernández, Folding and homodimerization of wheat germ agglutinin, *Biophys. J.* 101 (2011) 1423–1431. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.07.037>.
- [69] P. Dumas, E. Ennifar, C. Da Veiga, G. Bec, W. Palau, C. Di Primo, A. Piñeiro, J. Sabin,

- E. Muñoz, J. Rial, Extending ITC to Kinetics with kinITC, *Methods Enzymol.* 567 (2016) 157–180. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2015.08.026>.
- [70] Á. Piñeiro, E. Muñoz, J. Sabín, M. Costas, M. Bastos, A. Velázquez-Campoy, P.F. Garrido, P. Dumas, E. Ennifar, L. García-Río, J. Rial, D. Pérez, P. Fraga, A. Rodríguez, C. Coteló, AFFINmeter: A software to analyze molecular recognition processes from experimental data, *Anal. Biochem.* 577 (2019) 117–134. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.02.031>.
- [71] D.A. Case, V. Babin, J.T. Berryman, R.M. Betz, Q. Cai, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, T.A. Darden, R.E. Duke, H. Gohlke, A.W. Goetz, S. Gusarov, N. Homeyer, P. Janowski, J. Kaus, I. Kolossváry, A. Kovalenko, T.S. Lee, S. LeGrand, T. Luchko, R. Luo, B. Madej, K.M. Merz, F. Paesani, D.R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, R. Salomon-Ferrer, G. Seabra, C.L. Simmerling, W. Smith, J. Swails, Walker, J. Wang, R.M. Wolf, X. Wu, P.A. Kollman, {Amber 14} OR - University of California, San Francisco, (2014). <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.17892.37766>.
- [72] J. Wang, R.M. Wolf, J.W. Caldwell, P.A. Kollman, D.A. Case, 20035\_Ftp, *J. Comput. Chem.* 56531 (2004) 1157–1174.
- [73] R. Anandakrishnan, B. Aguilar, A. V. Onufriev, H++ 3.0: automating pK prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulations, *Nucleic Acids Res.* 40 (2012) W537–W541. <https://doi.org/10.1093/nar/gks375>.
- [74] D. Alvarez-Garcia, X. Barril, Molecular simulations with solvent competition quantify water displaceability and provide accurate interaction maps of protein binding sites, *J. Med. Chem.* 57 (2014) 8530–8539. <https://doi.org/10.1021/jm5010418>.
- [75] D.R. Roe, T.E. Cheatham, PTRAJ and CPPTRAJ: Software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data, *J. Chem. Theory Comput.* 9 (2013) 3084–3095. <https://doi.org/10.1021/ct400341p>.
- [76] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, VMD: visual molecular dynamics., *J. Mol. Graph.* 14 (1996) 33–38.
- [77] V. Le Guilloux, P. Schmidtke, P. Tuffery, Fpocket: An open source platform for ligand pocket detection, *BMC Bioinformatics.* 10 (2009) 168. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-168>.
- [78] O. Trott, A.J. Olson, AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading., *J. Comput. Chem.* 31 (2010) 455–61. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.
- [79] L.S.-S. LLC, N. York, undefined NY, undefined 2015, The PyMOL molecular graphics system, version 1.8, (n.d.).
- [80] J. Pevsner, V. Hou, A.M. Snowman, S.H. Snyder, Odorant-binding protein. Characterization of ligand binding, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 6118–6125.

- [81] O. V. Stepanenko, O. V. Stepanenko, M. Staiano, I.M. Kuznetsova, K.K. Turoverov, S. D'Auria, The quaternary structure of the recombinant bovine odorant-binding protein is modulated by chemical denaturants, *PLoS One*. 9 (2014) 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085169>.
- [82] N.R. Syme, C. Dennis, S.E.V. Phillips, S.W. Homans, Origin of heat capacity changes in a “nonclassical” hydrophobic interaction, *ChemBioChem*. 8 (2007) 1509–1511. <https://doi.org/10.1002/cbic.200700281>.
- [83] G.I. Makhatadze, P.L. Privalov, Heat capacity of proteins. I. Partial molar heat capacity of individual amino acid residues in aqueous solution: Hydration effect, *J. Mol. Biol.* 213 (1990) 375–384. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80197-4](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80197-4).
- [84] E.A. Chavelas, E. García-Hernández, Heat capacity changes in carbohydrates and protein-carbohydrate complexes, *Biochem. J.* 420 (2009) 239–247. <https://doi.org/10.1042/BJ20082171>.
- [85] O. V. Stepanenko, D.O. Roginskii, O. V. Stepanenko, I.M. Kuznetsova, V.N. Uversky, K.K. Turoverov, Structure and stability of recombinant bovine odorant-binding protein: II. Unfolding of the monomeric forms, *PeerJ*. 2016 (2016). <https://doi.org/10.7717/peerj.1574>.
- [86] V.A. Parsegian, R.P. Rand, D.C. Rau, Macromolecules and water: Probing with osmotic stress, *Methods Enzymol.* 259 (1995) 43–94. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(95\)59039-0](https://doi.org/10.1016/0076-6879(95)59039-0).
- [87] M. Bello, G. Pérez-Hernández, D.A. Fernández-Velasco, R. Arreguín-Espinosa, E. García-Hernández, Energetics of protein homodimerization: Effects of water sequestering on the formation of  $\beta$ -lactoglobulin dimer, *Proteins Struct. Funct. Genet.* 70 (2008) 1475–1487. <https://doi.org/10.1002/prot.21639>.
- [88] M.Z. Papiz, L. Sawyer, E.E. Eliopoulos, A.C.T. North, J.B.C. Findlay, R. Sivaprasadarao, T.A. Jones, M.E. Newcomer, P.J. Kraulis, The structure of  $\beta$ -lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein, *Nature*. 324 (1986) 383–385. <https://doi.org/10.1038/324383a0>.
- [89] S.W. Cowan, M.E. Newcomer, T.A. Jones, Crystallographic refinement of human serum retinol binding protein at 2Å resolution, *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 8 (1990) 44–61. <https://doi.org/10.1002/prot.340080108>.
- [90] M. Bello, E. García-Hernández, Ligand entry into the calyx of  $\beta$ -lactoglobulin, *Biopolymers*. 101 (2014) 744–757. <https://doi.org/10.1002/bip.22454>.
- [91] E. Polverini, P. Lardi, A. Mazzini, R.T. Sorbi, C. Virna, R. Ramoni, R. Favilla, Characterization of a deswapped triple mutant bovine odorant binding protein, *Int. J. Mol. Sci.* 12 (2011) 2294–2314. <https://doi.org/10.3390/ijms12042294>.
- [92] E. Hajjar, D. Perahia, H. Débat, C. Nespoulous, C.H. Robert, Odorant binding and conformational dynamics in the odorant-binding protein, *J. Biol. Chem.* 281 (2006)

29929–29937. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604869200>.

- [93] J. Golebiowski, S. Antonczak, S. Fiorucci, D. Cabrol-Bass, Mechanistic events underlying odorant binding protein chemoreception, *Proteins Struct. Funct. Genet.* 67 (2007) 448–458. <https://doi.org/10.1002/prot.21307>.
- [94] P.N. Le Meillour, P. Lagant, J.P. Cornard, F. Brimau, C. Le Danvic, G. Vergoten, J.C. Michalski, Phenylalanine 35 and tyrosine 82 are involved in the uptake and release of ligand by porcine odorant-binding protein, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics.* 1794 (2009) 1142–1150. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.04.012>.
- [95] L. Charlier, C. Nespoulous, S. Fiorucci, S. Antonczak, J. Golebiowski, Binding free energy prediction in strongly hydrophobic biomolecular systems, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 9 (2007) 5761–5771. <https://doi.org/10.1039/b710186d>.
- [96] M. Bello, M.J. Fragoso-Vázquez, J. Correa Basurto, Energetic and conformational features linked to the monomeric and dimeric states of bovine BLG, *Int. J. Biol. Macromol.* 92 (2016) 625–636. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.071>.
- [97] B. Lakshmi, M. Mishra, N. Srinivasan, G. Archunan, Structure-Based Phylogenetic Analysis of the Lipocalin Superfamily, *PLoS One.* 10 (2015) e0135507. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135507>.
- [98] J. Gao, D.A. Bosco, E.T. Powers, J.W. Kelly, Localized thermodynamic coupling between hydrogen bonding and microenvironment polarity substantially stabilizes proteins, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16 (2009) 684–690. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1610>.
- [99] J. Roy, C.A. Laughton, Long-timescale molecular-dynamics simulations of the major urinary protein provide atomistic interpretations of the unusual thermodynamics of ligand binding, *Biophys. J.* 99 (2010) 218–226. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.03.055>.
- [100] P. Setny, R. Baron, J.A. McCammon, How can hydrophobic association be enthalpy driven?, *J. Chem. Theory Comput.* 6 (2010) 2866–2871. <https://doi.org/10.1021/ct1003077>.
- [101] R. Baron, P. Setny, J.A. Mccammon, Water in Cavity - Ligand Recognition, (2010) 12091–12097.
- [102] E. Persch, O. Dumele, F. Diederich, Molecular recognition in chemical and biological systems, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 54 (2015) 3290–3327. <https://doi.org/10.1002/anie.201408487>.
- [103] J. Ernst, R. Clubb, H. Zhou, A. Gronenborn, G. Clore, Demonstration of positionally disordered water within a protein hydrophobic cavity by NMR, *Science (80-. ).* 267 (1995) 1813–1817. <https://doi.org/10.1126/science.7892604>.

- [104] J. Golebiowski, S. Antonczak, D. Cabrol-Bass, Molecular dynamics studies of odorant binding protein free of ligand and complexed to pyrazine and octenol, *J. Mol. Struct. THEOCHEM.* 763 (2006) 165–174. <https://doi.org/10.1016/j.theochem.2006.01.013>.
- [105] R. Huber, M. Schneider, O. Epp, I. Mayr, A. Messerschmidt, J. Pflugrath, H. Kayser, Crystallization, crystal structure analysis and preliminary molecular model of the bilin binding protein from the insect *Pieris brassicae*, *J. Mol. Biol.* 195 (1987) 423–434. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(87\)90661-9](https://doi.org/10.1016/0022-2836(87)90661-9).
- [106] O.K. Gasymov, A.R. Abduragimov, P. Merschak, B. Redl, B.J. Glasgow, Oligomeric state of lipocalin-1 (LCN1) by multiangle laser light scattering and fluorescence anisotropy decay, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics.* 1774 (2007) 1307–1315. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2007.07.014>.
- [107] D. Sanchez, S. Ortega-Cubero, B. Åkerström, M. Herrera, M.J. Bastiani, M.D. Ganfornina, Molecular interactions of the neuronal GPI-anchored lipocalin Lazarillo, *J. Mol. Recognit.* 21 (2008) 312–322. <https://doi.org/10.1002/jmr.902>.
- [108] C. Jobichen, A.Z. Fernandis, A. Velazquez-Campoy, K.Y. Leung, Y.-K. Mok, M.R. Wenk, J. Sivaraman, Identification and characterization of the lipid-binding property of GrIR, a locus of enterocyte effacement regulator, *Biochem. J.* 420 (2009) 191–201. <https://doi.org/10.1042/BJ20081588>.
- [109] M.H. Niemi, M. Rytönen-Nissinen, I. Miettinen, J. Jänis, T. Virtanen, J. Rouvinen, Dimerization of lipocalin allergens, *Sci. Rep.* 5 (2015) 13841. <https://doi.org/10.1038/srep13841>.
- [110] C.S. Kielkopf, J.K.K. Low, Y.F. Mok, S. Bhatia, T. Palasovski, A.J. Oakley, A.E. Whitten, B. Garner, S.H.J. Brown, Identification of a novel tetrameric structure for human apolipoprotein-D, *J. Struct. Biol.* 203 (2018) 205–218. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2018.05.012>.
- [111] L. Anghel, A. Rogachev, A. Kuklin, R.V. Erhan,  $\beta$ -Lactoglobulin associative interactions: a small-angle scattering study, *Eur. Biophys. J.* (2019). <https://doi.org/10.1007/s00249-019-01360-9>.
- [112] M. Bello, G. Gutiérrez, E. García-Hernández, Structure and dynamics of  $\beta$ -lactoglobulin in complex with dodecyl sulfate and laurate: A molecular dynamics study, *Biophys. Chem.* 165–166 (2012) 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2012.03.009>.
- [113] G. Gutiérrez-Magdaleno, M. Bello, M.C. Portillo-Téllez, A. Rodríguez-Romero, E. García-Hernández, Ligand binding and self-association cooperativity of  $\beta$ -lactoglobulin, *J. Mol. Recognit.* 26 (2013) 67–75. <https://doi.org/10.1002/jmr.2249>.
- [114] M. Bello, Structural and energetic requirements for a second binding site at the dimeric  $\beta$ -lactoglobulin interface, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 34 (2016) 1884–1902.

<https://doi.org/10.1080/07391102.2015.1094413>.

- [115] M.J. Bennett, M.P. Schlunegger, D. Eisenberg, 3D domain swapping: A mechanism for oligomer assembly, *Protein Sci.* 4 (1995) 2455–2468. <https://doi.org/10.1002/pro.5560041202>.
- [116] A.M. Gronenborn, Protein acrobatics in pairs - dimerization via domain swapping, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 19 (2009) 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2008.12.002>.
- [117] M.A.B. Baker, R.M.G. Hynson, L.A. Ganuelas, N.S. Mohammadi, C.W. Liew, A.A. Rey, A.P. Duff, A.E. Whitten, C.M. Jeffries, N.J. Delalez, Y. V. Morimoto, D. Stock, J.P. Armitage, A.J. Turberfield, K. Namba, R.M. Berry, L.K. Lee, Domain-swap polymerization drives the self-assembly of the bacterial flagellar motor, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 23 (2016) 197–203. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3172>.
- [118] F. Rousseau, J.W.H. Schymkowitz, L.S. Itzhaki, The unfolding story of three-dimensional domain swapping., *Structure.* 11 (2003) 243–51. [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(03\)00029-7](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(03)00029-7).
- [119] N. Nandwani, P. Surana, H. Negi, N.M. Mascarenhas, J.B. Udgaonkar, R. Das, S. Gosavi, A five-residue motif for the design of domain swapping in proteins, *Nat. Commun.* 10 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08295-x>.

## 12 Anexo 1: Análisis estadístico

Con el objetivo de determinar posibles diferencias significativas entre las medias aritméticas de las poblaciones ( $\mu$ ) de los parámetros termodinámicos del monómero bOBP<sub>121G+</sub> y el dímero bOBP, se aplicó la prueba paramétrica *t* de student con un valor de significancia del 5% ( $\alpha=0.05$ ) y con el planteamiento de hipótesis siguiente:

Hipótesis nula  $H_0$ : Las  $\mu$  de los parámetros termodinámicos de unión ( $\Delta H$ ,  $T\Delta S$ ,  $\Delta G$  y  $K_a$ ) del monómero bOBP<sub>121G+</sub> no son significativamente diferentes a las del dímero bOBP.

Hipótesis alternativa  $H_1$ : Las  $\mu$  de los parámetros termodinámicos de unión ( $\Delta H$ ,  $T\Delta S$ ,  $\Delta G$  y  $K_a$ ) del monómero bOBP<sub>121G+</sub> son significativamente diferentes a las del dímero bOBP.

$H_0: \mu \text{ bOBP}_{121G+} = \mu \text{ bOBP}$

$H_1: \mu \text{ bOBP}_{121G+} \neq \mu \text{ bOBP}$

ligando	Parámetro termodinámico	bOBP		bOBP <sub>121G+</sub>		<i>gl</i>	<i>t</i> <sub>calculado</sub>
		$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s		
HEX	$\Delta H$ (kcal/mol)	-7.20	0.80	-7.53	0.10	5	0.84
	$T\Delta S$ (kcal/mol)	-0.25	0.50	-0.15	0.09	5	-0.40
	$\Delta G$ (kcal/mol)	-7.44	0.50	-7.37	0.07	5	-0.29
	$K_a$ ( $\mu\text{M}^{-1}$ )	2.30	1.40	2.0	0.50	5	0.41
OCT	$\Delta H$ (kcal/mol)	-11.44	1.35	-12.48	0.10	5	-1.59
	$T\Delta S$ (kcal/mol)	-2.64	1.40	-3.38	0.15	5	-1.08
	$\Delta G$ (kcal/mol)	-8.80	0.44	-9.1	0.12	5	-1.33
	$K_a$ ( $\mu\text{M}^{-1}$ )	2.04	1.50	3.70	0.50	5	2.12

Tabla 1. Parámetros estadísticos

Con una probabilidad de 0.975 y con 5 grados de libertad (*gl*), los valores críticos de *t* son  $\pm 2.57$ . Puesto que todos los valores de *t*<sub>calculado</sub> se encuentran en la región de aceptación ( $-2.57 < t < 2.57$ ), no es posible rechazar  $H_0$ .

Con base en los resultados estadísticos de la Tabla 1, se puede concluir que no hay evidencia de diferencias significativas entre las  $\mu$  de los parámetros termodinámicos del monómero bOBP<sub>121G+</sub> y el dímero bOBP.



## Enthalpically-driven ligand recognition and cavity solvation of bovine odorant binding protein

Homero Gómez-Velasco<sup>a</sup>, Arturo Rojo-Domínguez<sup>b</sup>, Enrique García-Hernández<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Química, Ciudad Universitaria, Ciudad de México 04510, Mexico

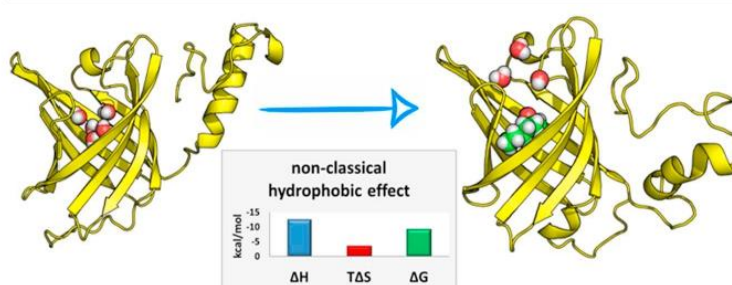
<sup>b</sup> Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa, Departamento de Ciencias Naturales, Mexico



### HIGHLIGHTS

- Recognition energetics of bOBP in solution was determined by ITC.
- Ligand recognition exhibited a non-classical hydrophobic effect signature.
- MD simulations revealed significant solvation inside the binding pocket.
- Water molecules inside the binding pocket seem to be of high enthalpy.
- Lipocalins differ in the underlying mechanism to achieve ligand affinity.

### GRAPHICAL ABSTRACT



### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Lipocalin  
Isothermal titration calorimetry  
Molecular dynamics simulation  
Non-classical hydrophobic effect  
Hydrophobic binding

### ABSTRACT

Lipocalins are a widely distributed family of extracellular proteins typically involved in the transport of small hydrophobic molecules. To gain new insights into the molecular basis that governs ligand recognition by this ancient protein family, the binding properties of the domain-swapped dimer bovine odorant binding protein (bOBP) and its monomeric mutant bOBP<sub>121G+</sub> were characterized using calorimetric techniques and molecular dynamics simulations. Thermal unfolding profiles revealed that the isolated bOBP subunits behave as a cooperative folding unit. In addition, bOBP and bOBP<sub>121G+</sub> exhibited similar ligand binding properties, characterized by a non-classical hydrophobic effect signature. The energetic differences in the binding of bOBP to 1-hexen-3-ol and the physiological ligand 1-octen-3-ol were strikingly larger than those observed for the interaction of other lipocalins with congeneric ligands. MD simulations revealed that the recurrent opening of transient pores in the submicrosecond timescale allows a profuse exchange of water molecules between the protein interior and the surrounding solvent. This picture contrasts with other lipocalins whose ligand-free binding cavities are devoid of solvent molecules. Furthermore, the simulations indicated that internal water molecules solvate the protein cavity suboptimally, forming fewer hydrogen bonds and having lower density and

**Abbreviations:** bOBP, wild-type bovine odorant binding protein; bOBP<sub>121G+</sub>, monomeric bOBP single mutant; bOBP<sub>GCC</sub>, monomeric bOBP triple mutant; rOBP3, rat odorant binding protein variant 3; pOBP, porcine OBP; rOBP-1F, rat OBP variant 1F; mMUP-I, mouse major urinary protein variant 1; OCT, 1-octen-3-ol; HEX, 1-hexen-3-ol; ITC, isothermal titration calorimetry; DSC, differential scanning calorimetry; CD, circular dichroism;  $R_H$ , hydrodynamic radius; MM, apparent molecular mass;  $\Delta G_{CH_2}$ , binding free energy of Gibbs per methylene group;  $\Delta H_{CH_2}$ , binding enthalpy per methylene group;  $T\Delta S_{CH_2}$ , binding entropy per methylene group;  $\Delta C_{p_{CH_2}}$ , binding heat capacity per methylene group;  $C_{p_{exc}}$ , excess heat capacity;  $T_{max}$ , temperature of the  $C_{p_{exc}}$  maximum;  $\Delta H_{vH}$ , van't Hoff enthalpy change;  $\Delta H_{cat}$ , calorimetric enthalpy change; RMSD, root-mean-square deviation; RMSF, root-mean-square fluctuation;  $N_w$ , number of water molecules inside the binding cavity;  $N_w^-$ , average  $N_w$ ;  $E_{pot}$ , potential energy;  $E_{elec}$ , coulombic energy;  $E_{vdw}$ , van der Waals energy;  $N_{hb}$ , number of hydrogen bonds;  $\Delta N_w$ , number of water molecules determined through osmotic stress experiments.

\* Corresponding author.

E-mail address: [egarciah@unam.mx](mailto:egarciah@unam.mx) (E. García-Hernández).

<https://doi.org/10.1016/j.bpc.2019.106315>

Received 20 November 2019; Received in revised form 5 December 2019; Accepted 8 December 2019

Available online 09 December 2019

0301-4622/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.



higher potential energy than bulk water molecules. Upon ligand occupation, water molecules were displaced from the binding cavity in an amount that depended on the ligand size. Taken together, calorimetric and MD-simulation results are consistent with a significant contribution of cavity desolvation to the enthalpically-driven interaction of bOBP with its hydrophobic ligands.

## 1. Introduction

Ligand recognition by proteins is a crucial feature for most biological functions. Binding stabilization involves the balance of different weak intermolecular interactions as well as changes in the degree of freedom of the solvent and the conformation of the solutes. In the case of non-polar ligands, one of the major determinants of the interaction is the hydrophobic effect, which has classically been explained in terms of the entropy increase of solvent molecules released upon binding to non-polar cavities in the protein receptors [1–3]. However, a reduction in enthalpy has been shown to be the dominant favorable contribution in the recognition of hydrophobic ligands by an increasing number of proteins and other chemical entities [4–7]. Such enthalpically-driven binding, called the “non-classical hydrophobic effect”, has been related to an anomalous hydration of the receptor-binding site previous to the interaction with the ligand [4,8–11].

Lipocalins are a widespread family of small extracellular proteins typically involved in the transport of small hydrophobic molecules. In spite of a large divergence in the primary structure (overall identity < 20%), lipocalins share a highly preserved folding motif that comprises an antiparallel  $\beta$ -barrel wrapped in the shape of a calyx, flanked by one or more  $\alpha$ -helices [12]. The internal space of the calyx can bind a broad range of lipophilic ligands, a property that endows lipocalins with the ability to function as efficient carrier devices. Despite reports on numerous lipocalin members [10,13–16], elucidation of the determinants of selectivity, binding mechanisms, and energetics of ligand recognition remains a significant challenge, a situation that has precluded the development of quantitative correlations between structural properties and ligand binding energetics [17,18]. Moreover, the role of water molecules buried in hydrophobic binding cavities can be crucial in the kinetics and thermodynamics of ligand binding; but the effects of protein desolvation has remained elusive and studied in only a few lipocalins [10,19–21].

As for the energetics basis of ligand recognition, mouse major urinary protein I (mMUP-I) is the most studied lipocalin so far. By using a multi-approach strategy that included isothermal titration calorimetry, NMR spectroscopy, x-ray crystallography, and molecular dynamics simulations, Homans' group unraveled elementary energetic contributions that rationalized the non-classical hydrophobic effect exhibited by mMUP-I [10]. The authors provided evidence that the binding pocket of apo mMUP-I is sub-optimally hydrated. Therefore, a largely decreased entropic gain, but also a significantly decreased enthalpic penalty, arises from protein desolvation compared to that expected from the desolvation a fully hydrated surface. This pre-dewetted state along with a marginal conformational entropy change of the protein (due to compensated increases and restrictions in the mobility of different residues distributed throughout the  $\beta$ -barrel) allow quantitatively explain the small overall binding entropy [22,23]. In turn, the favorable dispersion interactions established between the protein and the ligand far exceed the cost of desolvating the ligand molecule [24–26]. A recent study characterized the binding of rat OBP protein 3 (rOBP3) to a series of aliphatic  $\gamma$ -lactones [20]. For all the ligands assayed, the binding was enthalpically driven. Significantly more negative binding enthalpies and entropies were observed for single Phe→Ala mutants of rOBP3. The authors reasoned that the replacement of the bulky residue by a small one expanded the volume of the binding cavity, presumably prompting the incorporation of a larger number of solvent molecules into the apo cavity, which in turn yielded a more favorable enthalpy upon displacement by the ligand. However, no characterization of the internal

solvation of the rOBP3 binding pocket was undertaken in that study.

Bovine odorant binding protein (bOBP) is found in great abundance in the nasal mucosa. The endogenous ligand of this lipocalin is the unsaturated alcohol 1-octen-3-ol (OCT), a volatile compound of bovine breath that is a potent insect attractant [27]. Accordingly, it has been proposed that one function of bOBP is to scavenge OCT from the nasal environment to reduce the incidence of insects and, consequently, their bites [28,29]. The hypothesis has also been raised that, like OBPs of other organisms [30], the bovine ortholog is involved in the olfactory process by serving as a carrier of non-polar odorants, solubilizing them and delivering them to olfactory receptors [31]. Some lipocalins, such as retinol-binding protein or  $\beta$ -lactoglobulin, have an open side at the top of the  $\beta$ -barrel that clearly functions as the entrance or “mouth” of the binding cavity [32–34]. In contrast, bOBP belongs to the subgroup of lipocalins whose binding cavity is completely closed, a situation that has made difficult to clarify the communication mechanism between the protein interior and the surrounding solvent. As noted in the seminal reports on bOBP structure, the rotation of the F<sup>36</sup> or Y<sup>83</sup> side-chains, residues located at the top of the  $\beta$ -barrel, may generate a direct communication path between the protein interior and the solvent milieu [35,36]. However, although their rotation is not sterically impeded by the neighboring residues, these aromatic residues show the same closed conformation in all experimental structures. bOBP forms dimers through a domain swapping mechanism that is not observed in any other lipocalin. In the dimer, the C-terminal segment (38 residues comprising two helices, a  $\beta$ -strand and a turn) is moved apart from its  $\beta$ -barrel domain and flanks the other subunit completing a typical lipocalin structure, while the other subunit makes the same swapping symmetrically [35,37]. Saliency, engineering this protein by inserting a glycine residue after position 121 completely abolishes the domain swapping producing a fully monomeric mutant (bOBP<sub>121G+</sub>), with its C-terminal region exposed to the solvent [38]. Additional mutations to replace W64 and H116 with Cys yielded the triple mutant bOBP<sub>GCC</sub>, which formed a disulfide bridge that packed the C-terminus against its own  $\beta$ -barrel [39]. A schematic representation of the 3D structures of the three versions of bOBP is presented in the *Supplementary material* (Fig. S1).

To gain new insights into the energetic bases that govern ligand recognition by lipocalins, in this work we characterized the binding of bOBP to its physiological ligand OCT and to the congeneric molecule 1-hexen-3-ol (HEX) using isothermal titration calorimetry and molecular dynamics simulations. HEX was taken as a control compound to assess the effect of ligand length on the association energetics. We also characterized the binding properties of bOBP<sub>121G+</sub>, as this mutant could be considered a faithful monomeric model of the wild-type bOBP subunits in a dissociated state [38]. The two proteins had the same binding properties, exhibiting an enthalpy-driven interaction. The thermodynamic binding signatures of HEX and OCT, as well as the results derived from molecular dynamics simulations, were compared in order to yield a complementary depiction of the mechanism and energetics of the binding process by bOBP. Notable, a comparison with other lipocalins revealed that lipocalins differ largely in the energetic basis of the recognition of hydrophobic ligands.

## 2. Material and methods

### 2.1. Reagents and solutions

Chemicals were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO,



USA) or Goldbio (St. Louis, MO, USA). Unless otherwise stated, all experiments were performed in a 20 mM phosphate buffer solution, pH 7.4, supplemented with 100 mM NaCl.

## 2.2. Expression and purification of recombinant proteins

The bOBP (MM = 18,503 Da, 159 residues per subunit) and bOBP<sub>121G+</sub> (MM = 18,560 Da, 160 residues) nucleotide sequences with a 6xHis-tag at the N-terminus cloned into the vector pT7-7 were kindly provided by Dr. Roberto Ramoni, Università di Parma, Italy. Protein expression was carried out in *E. coli* strain Rosetta. The overnight cultures grown at 37 °C in LB medium were diluted 1:100 in fresh medium containing ampicillin (100 µg/ml) and incubated at 37 °C until they reached an OD<sub>600</sub> of 0.5–0.6. Then, 0.5 mM isopropyl 1-thio-β-D-galactopyranoside was added to the cultures and incubated at 30 °C for 5 h. Cells from 1.51 were harvested by centrifugation (10 min at 5500 × g, 4 °C), suspended in 40 ml of lysis buffer (100 mM phosphate, 200 mM NaCl, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, pH 7.4) and lysed by sonication with a Misonix 3000 sonicator using a 5.0 output with a sonication pulse rate of 20 s on, 40 s off, for 10 min at 4 °C. The soluble fractions were clarified by centrifugation (45 min at 30,000 × g), filtered and subjected to affinity chromatography (His-Trap-FF, GE Healthcare, USA). Before sample injection, the affinity column was equilibrated with 5 column volumes of binding buffer (lysis buffer + 30 mM imidazole). The unbound protein was washed with 5 column volumes of binding buffer, and the recombinant proteins were eluted with 5 column volumes of binding buffer containing 500 mM imidazole. To remove co-purified ligands, the recombinant protein was mixed with ethanol (1:2 volume:volume), and incubated 2 h at 4 °C. The pellet was recovered after centrifugation (20 min at 7000 × g, 4 °C), and lyophilized. Finally, the protein was dialyzed for 2 × 12 h against 20 mM phosphate, 100 mM NaCl, pH 7.4. Protein purity was determined through SDS-PAGE in 12% polyacrylamide gels. Protein concentrations were determined using an extinction coefficient of 23,500 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> at 280 nm referred to monomer/subunit equivalent [40].

## 2.3. Dynamic light scattering

DLS experiments were performed with a DynaPro-801 molecular sizing instrument (Protein Solutions Co.) as described previously [41], using protein concentrations in the 0.03–0.15 mM range. The hydrodynamic radius (R<sub>h</sub>) and the apparent molecular mass (MM) were estimated based on an autocorrelation analysis of scattered light intensity data.

## 2.4. Differential scanning calorimetry

DSC measurements were carried out with MicroCal VP-Capillary DSC equipment (Malvern Panalytical Inc., USA). Buffer-buffer baselines were obtained under the same experimental conditions and subtracted from sample traces. Reheating runs were carried out to determine the calorimetric reversibility of the denaturation process. All results presented were obtained at a scan rate of 60 °C/h. The endotherms were fitted to independent transition-unfolding models programmed in the MicroCal Origin v7 software (OriginLab Co., MA, USA).

## 2.5. Isothermal titration calorimetry (ITC)

ITC measurements were carried out using a MicroCal™ iTC200 instrument (GE Healthcare, Northampton, MA, USA). The titration schedule consisted of 15–35 consecutive injections of ligand with a 5-min interval between injections, using a stirring rate of 750 rpm. The dilution heat of the ligand was obtained by adding ligand to a buffer solution under identical conditions and the same injection schedule used with the protein sample. All samples were degassed for 10 min

prior to the experiment. Binding parameters were determined by using an identical and independent binding site model:

$$Q = \frac{nM_t \Delta H_b V_o}{2} \left[ 1 + \frac{L_t}{nM_t} + \frac{1}{nK_b M_t} - \sqrt{\left( 1 + \frac{L_t}{nM_t} + \frac{1}{nK_b M_t} \right)^2 - \frac{4L_t}{nM_t}} \right]$$

where Q is the normalized heat evolved per mol of ligand at the end of the *i*<sup>th</sup> injection, K<sub>b</sub> is the binding constant, ΔH<sub>b</sub> is the enthalpy change, n is the stoichiometry, V<sub>o</sub> is the working volume of the cell, and L<sub>t</sub> and M<sub>t</sub> are the total ligand and macromolecule concentrations, respectively. The heat released in the *i*<sup>th</sup> injection is:

$$\Delta Q_i = Q_i + \frac{v_i(Q_i + Q_{i-1})}{2V_o} - Q_{i-1} + q_{dil}$$

where v<sub>i</sub> is the aliquot volume added at injection *i* and q<sub>dil</sub> is a fitting term introduced to account for experimentally uncorrected dilution heat effects.

The kinITC method [42], implemented in the analysis software AFFINImeter [43], was employed to extract the underlying kinetic information from the ITC differential power curve. The equilibration time curve, built from the analysis of the time required for the calorimetric signal to return to the baseline after an injection, was fitted to determine the association rate (k<sub>on</sub>) and off-rate (k<sub>off</sub>) constants.

All non-linear regressions were carried using the MicroCal Origin v7 and the AFFINImeter software [43].

## 2.6. Molecular dynamics simulations

1 µs-long MD simulations for each system were performed with the AMBER 14 suite using the FF99SB force field [44]. 1-octen-3-ol and 1-hexen-3-ol were parameterized with the general Amber force field (GAFF) for organic molecules and ANTECHAMBER suite [45]. Protonation at pH 7.4 and 0.1 ionic strength, was performed using the H++ software [46]. Octahedral solvation cells were generated with 18 Å minimum distance from the protein to the box edge, using the TIP3P solvent model. Counterions were placed in random positions to neutralize the system. The total number of atoms in the apo bOBP, apo bOBP<sub>121G+</sub>, bOBP<sub>121G+</sub>-HEX and bOBP<sub>121G+</sub>-OCT systems were 109,340, 59,244, 59,263 and 59,269, respectively. Periodic boundary conditions were used, and the simulations were carried out in the NPT ensemble using Langevin dynamics (37 °C, 1 atm). The long-range electrostatics were accounted for using the particle-mesh Ewald summation method as implemented in the PMEEMD module of the AMBER suite, using a cut-off value of 9 Å to split direct electrostatics and Ewald summation. The SHAKE algorithm was enabled. Conjugate gradient minimization (5000 steps) followed by NVT warming up (0.8 ns) and NPT equilibration (1 ns) using Langevin dynamics were performed to equilibrate the solvent and relax the structures. Running scripts were set up with the help of the pyMDmix software [47]. Analysis of the trajectories was performed with CPPTRAJ [48] and VMD [49] software packages. The electrostatic (E<sub>elec</sub>) and van der Waals (E<sub>vdw</sub>) contributions for individual water molecules were modeled using Coulomb and Lennard-Jones potentials, respectively; energies were calculated using the LIE command of CPPTRAJ, applying a cutoff of 12 Å. Binding pocket volumes were calculated with the Fpocket program [50]. Docking runs against the protein were carried out using the AutoDock Vina program [51], allowing conformational flexibility of the ligand. Molecular representations were produced with the PYMOL program [52].



### 3. Results

#### 3.1. Thermal stability of the wild dimer bOBP and its monomeric mutant bOBP<sub>121G+</sub>

The thermal stability of bOBP and bOBP<sub>121G+</sub> were assessed by DSC. bOBP displayed endotherms consisting of two peaks, while bOBP<sub>121G+</sub> displayed a single symmetric peak (Fig. 1). The calorimetric traces of the monomeric and dimeric proteins were fitted to an unfolding model of one and two transitions, respectively. The deconvolution analysis showed that the unfolding of bOBP<sub>121G+</sub> is consistent with a two-state process ( $\Delta H_{\text{vH}}/\Delta H_{\text{cal}} = 0.96$ ;  $\Delta H_{\text{cal}} = 151 \text{ kcal mol}^{-1}$ ), with a fitted melting temperature ( $T_m$ ) of  $79.6 \pm 0.0^\circ\text{C}$ . In the case of the dimer, the fitted  $T_m$  of the first peak was independent of protein concentration and showed a value close to that of the monomeric mutant ( $79.5 \pm 0.0$  and  $79.8 \pm 0.0^\circ\text{C}$  for the low and high protein concentration, respectively). In contrast, the  $T_m$  of the second peak showed a significant variation with the protein concentration ( $83.4 \pm 0.0$  and  $85.4 \pm 0.0^\circ\text{C}$  for the low and high protein concentration, respectively), indicating the occurrence of dimer dissociation. To verify the aggregation state of the proteins, DLS measurements were carried out at room temperature. The apparent size of bOBP ( $R_H = 3.1 \pm 0.1 \text{ nm}$  and  $MM = 44 \pm 2 \text{ kDa}$ ) was somewhat larger than that calculated from the amino acid sequence ( $18.5 \text{ kDa} \times 2$  subunits), which is consistent with the moderately elongated shape of the dimer ( $\sim 40 \times 40 \times 70 \text{ \AA}^3$  [37]). In contrast, the apparent size of bOBP<sub>121G+</sub> ( $R_H = 2.4 \pm 0.2 \text{ nm}$  and  $MM = 27 \pm 2 \text{ kDa}$ ) was significantly larger than that based on the amino acid sequence ( $18.6 \text{ kDa}$ ), a difference that confirms that the swapping domain is not packed against its own  $\beta$ -barrel motif [38,39]. Judging by a polydispersity index  $\leq 20\%$ , both proteins were predominantly monodisperse. Taken together, these results showed that the thermal unfolding of recombinant bOBP involves the unfolding of monomeric and dimeric subunits that coexist at high temperatures under a slow exchange regime, while the properties of the monomeric mutant, which exhibits a simple two-state unfolding process, closely resemble those of the dissociated wild-type subunits.

#### 3.2. bOBP and bOBP<sub>121G+</sub> exhibit similar ligand-binding energetics characterized by a non-classical hydrophobic effect

The binding energetics of HEX and OCT to bOBP and bOBP<sub>121G+</sub> were measured by highly sensitive ITC (Fig. 2). In initial measurements, binding stoichiometries ( $n$ ) of 0.3–0.5 mol of ligand per mol of subunit/monomer were obtained, suggesting a partial occupation of the binding sites. After ethanol delipidation,  $n$  consistently varied within the range of 0.85–1.05. The binding isotherms were satisfactorily fitted using a model of single and independent binding sites, with no evidence of cooperativity between subunits (Fig. 2A–B). Within the experimental uncertainty, both proteins showed the same ligand binding energetics, indicating that the oligomerization state does not affect the binding capacity of the lipocalin. The thermodynamic signatures described an enthalpically driven interaction for both ligands, accompanied by a small entropy decrease (Fig. 2C). The lack of two methylene groups in HEX with respect to OCT elicited a decrease of one order of magnitude in  $K_b$ . This affinity decrease was due to a markedly less favorable binding enthalpy ( $\Delta\Delta H_{\text{HEX}}^{\text{OCT}} \sim -5 \text{ kcal mol}^{-1}$ ), which is comparable to the formation enthalpy of a hydrogen bond in vacuum [53]. The association rate ( $k_{\text{on}}$ ) and dissociation rate ( $k_{\text{off}}$ ) constants were determined from the raw calorimetric data using the kinITC method [42], which considers the variation of the time of return of the signal to equilibrium at each injection (Fig. 3). Consistently, the two proteins showed very similar kinetic constants. In the case of OCT,  $k_{\text{off}}$  values were consistent with a dissociation half time ( $t_{1/2}$ ) of  $\sim 6$  min, which is in good agreement with the value previously reported for the dissociation of bOBP and isotopically labeled 3,7-dimethyloctan-1-ol [54].

HEX binding was characterized by a somewhat slower  $k_{\text{on}}$  and a one order of magnitude faster  $k_{\text{off}}$ ,  $t_{1/2} \sim 0.5$  min (Fig. 3).

To obtain the complete thermodynamic binding signatures, calorimetric titrations were performed as a function of temperature. As the size of the corresponding error bars reveals (Fig. 2C), a considerable dispersion of the bOBP binding parameters was observed among independent experiments. Although the reason for this dispersion is unclear, it has been shown that recombinantly produced bOBP has local alterations in the secondary and tertiary structures in relation to those of purified bOBP from its natural source. [55]. In addition, bOBP exhibits a complex folding process *in vitro*, characterized by a strong and slow hysteresis between the unfolded monomer and the folded dimer [40,56]. Therefore, it seems feasible that an underlying heterogeneity between different protein sample preparations was responsible for the relatively large inter-experimental variations of the bOBP binding parameters. On the contrary, the measurements for the monomeric mutant yielded considerably smaller data dispersion, which allowed a reliable determination of  $\Delta C_{p,b}$ . The thermodynamic binding profiles of bOBP<sub>121G+</sub> to HEX and OCT as a function of temperature are shown in Fig. S2. The  $\Delta C_{p,b}$  values of both ligands were the same within experimental uncertainty ( $\Delta C_{p,b}^{\text{HEX}} = -95 \pm 6$  vs  $\Delta C_{p,b}^{\text{OCT}} = -97 \pm 7 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ). Therefore, the differences between HEX and OCT in both binding enthalpies and entropies were nearly constant throughout the temperature range spanned.

#### 3.3. Analysis of binding parameters as a function of ligand length revealed distinctly different specific signatures between lipocalins

Like bOBP, mMUP-I and rOBP3 are two lipocalins whose binding cavity is completely closed. They also exhibit ligand binding driven by a non-classical hydrophobic effect. Since the binding of mMUP-I and rOBP3 has been characterized as a function of the ligand length using a series of primary aliphatic alcohols [26,57] and  $\gamma$ -lactones [20], respectively, a direct comparison of the energetic parameters per mol of methylene group was feasible. The specific energetic contributions ( $\Delta X_{\text{CH}_2}$ ) of these two lipocalins, as well as those of bOBP, are summarized in Table 1. An inspection of the data revealed that none of the

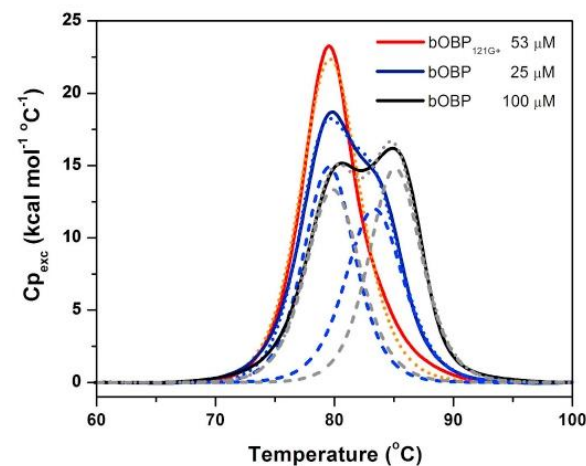
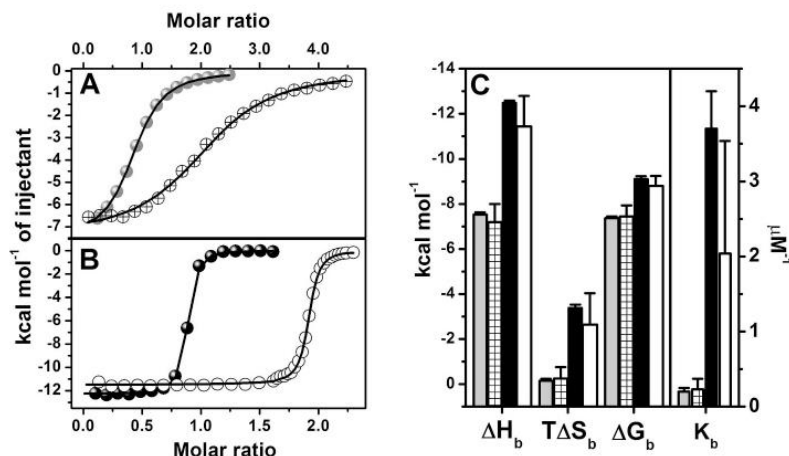
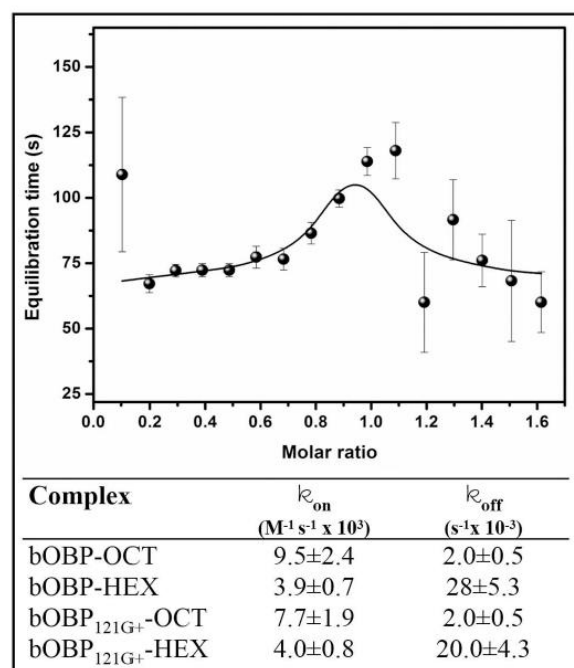


Fig. 1. Thermal unfolding of bOBP and its monomeric mutant bOBP<sub>121G+</sub> determined by DSC. The experimental endotherms (solid lines) of the monomeric and dimeric proteins were fitted to an equilibrium model of one and two transitions, respectively. The dotted and dashed lines (in lighter colors) correspond to the global and individual transitions, respectively, resulting from the best fitting of the respective model to the calorimetric traces. According to the area recovered in a second scan, the reversibility of the unfolding process of bOBP and bOBP<sub>121G+</sub> was  $\sim 50\%$  and  $80\%$ , respectively.



**Fig. 2.** Calorimetric determination of the binding parameters. Gray, gridded, black and white symbols/bars correspond to bOBP<sub>121G+</sub>-HEX, bOBP-HEX, bOBP<sub>121G+</sub>-OCT, and bOBP-OCT interaction data, respectively. **A)** Isothermal binding curves for the titration of 25 μM bOBP (dimer equivalent) or 50 μM bOBP<sub>121G+</sub> with 1.3 mM HEX. **B)** Isothermal binding curves for the titration of 5 μM bOBP (dimer equivalent) or 10 μM bOBP<sub>121G+</sub> with 170 μM OCT. The solid lines correspond to the best fitting of a model of a single and independent type of binding sites. **C)** Binding signatures. All measurements were performed at least in triplicate at 30 °C in 0.02 M phosphate, 0.1 M NaCl, pH 7.4.



**Fig. 3.** Calorimetric equilibration time curve and kinetic constants determined using the kinITC method [43]. As an example of the experimental results, the equilibration time curve for the bOBP<sub>121G+</sub>-OCT complex is shown. Measurements were performed in 0.02 M phosphate, 0.1 M NaCl, pH 7.4, at 30 °C.

**Table 1**  
Specific binding energetics (per methylene group of ligand) of lipocalins<sup>a</sup>.

Lipocalin	Ligands	$\Delta H_{CH_2}$ kcal mol <sup>-1</sup>	$T\Delta S_{CH_2}$ kcal mol <sup>-1</sup>	$\Delta G_{CH_2}$ kcal mol <sup>-1</sup>	$\Delta Cp_{CH_2}$ cal mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup>	T °C	Sequence identity <sup>b</sup> (%)	References
bOBP	Hexenol, octenol	-2.5 ± 0.1	-1.6 ± 0.2	-0.9 ± 0.1	-1 ± 4	30	100	This work
mMUP-I	Pentanol to nonanol	-1.4 ± 0.0	-0.4 ± 0.0	-1.0 ± 0.0	-12 ± 4	27	24	[26,57]
rOBP3	γ-pentalactone to γ-decalactone	+2.4 ± 0.2	+2.5 ± 0.1	-0.1 ± 0.1	N.D.	25	26	[20]

<sup>a</sup> The binding of bovine β-lactoglobulin to fatty acids of different length has been characterized in two different studies [60,61]; however, since the two data sets lead to opposite behaviors of the  $\Delta X_{CH_2}$  parameters, this lipocalin was not considered in the present analysis.

<sup>b</sup> bOBP sequence taken as reference. Identity between rOBP3 and mMUP-I = 60%.

specific binding parameters shows a consensus behavior between the three lipocalins. bOBP and mMUP-I exhibit a very similar favorable  $\Delta G_{CH_2}$  value, while the value of rOBP3 is almost isoergonic. Notably, while both bOBP and mMUP-I show favorable  $\Delta H_{CH_2}$  and unfavorable  $T\Delta S_{CH_2}$  contributions, rOBP3 exhibits the opposite contributions. In turn, bOBP and mMUP-I show significant differences, with  $\Delta H_{CH_2}$  and  $T\Delta S_{CH_2}$  being more negative for the former lipocalin. Furthermore, a methylene group decreases  $\Delta Cp_{CH_2}$  in mMUP-I with a magnitude close to that expected from the desolvation of a methylene group within an aliphatic model compound [58,59], while the corresponding contribution is marginal in bOBP. Overall, the above data indicate that despite sharing very similar architectures, bOBP, mMUP-I and rOBP3 differ markedly from each other with respect to the underlying mechanism to generate affinity for the ligand.

### 3.4. MD simulations revealed significant solvation inside the binding pocket

In order to investigate the molecular origins of the enthalpy-driven interaction of bOBP and its monomeric mutant with hydrophobic molecules, the conformational and solvation properties of the binding pocket were characterized by 1 μs-long unbiased MD simulations in explicit solvent. Since the structure of ligand-free bOBP has not yet been solved, a model was built by removing the ligand from the x-ray structure of the bOBP-OCT complex (PDB ID: 1g85 [28]). The overall structure of the β-barrel remained constant throughout the simulation, with an average structure very similar to the crystal structure (RMSD = 0.6 Å). According with the time course of RMSD, the relaxation of the β-barrel took place within the first 100 ns of simulation (Fig. S3). Inspection of the trajectory disclosed a significant and dynamic internal solvation of the binding cavity. As similar results were observed for the two subunits, only one subunit is described below for the sake of simplicity, although the corresponding data for the other subunit are shown in Fig. S4. Fig. 4 shows the time course of the



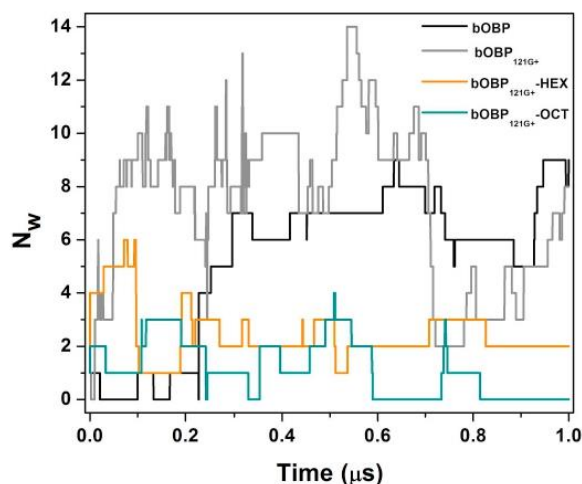


Fig. 4. Time course of the number of water molecules inside the binding pocket ( $N_w$ ) as determined from 1  $\mu$ s-long unrestrained MD trajectories. For all the systems, a pre-equilibration period (250 ns for bOBP and 100 ns for apo and ligand-bound bOBP<sub>121G+</sub>) was discarded for the calculation of the average  $N_w$  value.

number of water molecules completely immersed in the binding cavity ( $N_w$ ) as a function of time. During the pre-equilibration time, a water molecule was sequestered in the binding cavity, lasting buried during the first 20 ns of productive simulation, after which it was expelled. Within the following 200 ns, a water molecule was reabsorbed and released repeatedly by the protein cavity. Between 230 and 300 ns,  $N_w$  underwent a sharp increase to reach an average value ( $N_w$ ) of  $6.9 \pm 1.0$  for the rest of the simulation.

The structures of apo bOBP<sub>121G+</sub> and its complexes with HEX and OCT were built by inserting a Gly residue after position 121, using the structure of the bOBP-OCT complex as a template (Fig. S1). In agreement with previous biophysical data [38,39,62,63], the swapping domain in bOBP<sub>121G+</sub> did not establish stable contacts with the  $\beta$ -barrel during the simulation (data not shown). According to the RMSD and RMSF data, the average conformation of the  $\beta$ -barrel of apo bOBP<sub>121G+</sub> was very similar to that of bOBP, although with a slightly increased structural flexibility (Fig. S3). Like the dimer, apo bOBP<sub>121G+</sub> tended to sequester water molecules inside the binding cavity. However, the monomer reached a slightly higher  $N_w$  value ( $7.6 \pm 2.9$ ) in a shorter time (60 ns) than the dimer (Fig. 4). The trajectories of bOBP<sub>121G+</sub> in complex with HEX or OCT also revealed stable RMSD profiles, with an average structure of the  $\beta$ -barrel very similar to that of the apoproteins (Fig. S3). In the presence of a ligand, the protein cavity was less prone to incorporate water molecules (Fig. 4). HEX and OCT elicited a decrease in  $N_w$  of  $\sim 5$  and  $\sim 7$  respect to the apoprotein, respectively.

### 3.5. Experimental assessment of water molecule exchange

Osmotic stress measurements were conducted using sucrose as a perturbing agent to experimentally assess the exchange of water molecules coupled to ligand recognition by bOBP<sub>121G+</sub> [64,65]. Nonionic osmolytes reduce the chemical activity of bulk water. Thus, the number of water molecules exchanged,  $\Delta N_w$ , can be determined from the dependence of  $K_b$  on the osmolality of the solution [64]:

$$\Delta N_w = -55.6 \frac{\partial \ln K_b}{\partial \text{osmolality}}$$

The MD results determined a relatively small  $\Delta N_w$  value. Therefore, a small dependence of  $K_b$  on the osmolality of the solution was

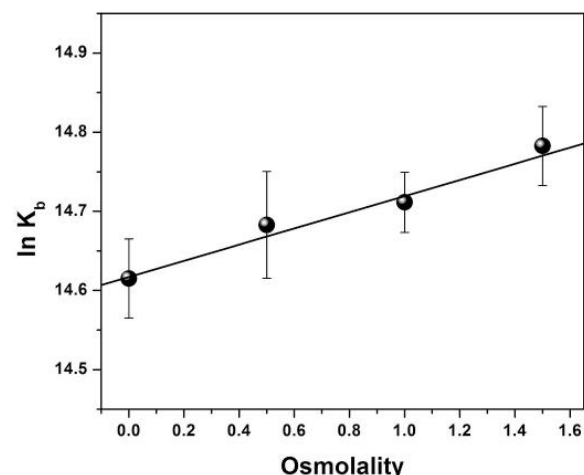


Fig. 5. Osmotic stress measurements.  $K_b$  for the bOBP<sub>121G+</sub>-OCT complex was measured calorimetrically as a function of sucrose osmolality, pH 7.4, 37 °C.

expected. Accordingly, measurements were performed only with OCT, the ligand that in principle would displace the largest number of water molecules. As shown in Fig. 5,  $K_b$  progressively increased as the concentration of the osmotic agent was raised, consistent with the net release of water molecules. A regression analysis of the data yielded  $\Delta N_w = -6 \pm 3$ , a value that is in good agreement with that determined from the MD simulations ( $\sim 7$  water molecules). It is worth noting that the associated standard error of the slope in Fig. 5 is comparable to those observed in other protein systems characterized by the same approach. For instance, a  $\Delta N_w$  value of  $+36 \pm 3$  (i.e., water sequestration) was determined for the formation of the  $\beta$ -lactoglobulin homodimer, a value that is in good agreement with the average number of water molecules observed at the dimer interface in MD simulations [65].

### 3.6. Water molecules inside the binding pocket seem to be of high enthalpy

Several metrics related to solvation within the protein binding cavity were determined from the MD trajectories. Results are summarized in Table 2. As indicated above, ligand-free bOBP and bOBP<sub>121G+</sub> showed approximately the same  $N_w$  value. Considering the average volume of the binding pocket, the density of water molecules inside the apo cavities was about half of the experimental density of liquid water. Notably, water molecules showed significant mobility inside the binding cavity, with an average RMSF of  $3.5 \pm 0.1$  Å. The volume covered by each molecule assuming a sphere with radius equal to that RMSF value would be  $\sim 120$  Å<sup>3</sup>, which is a significant fraction of the binding cavity volume (Table 2). In fact, no preferential hydration sites were observed in the binding cavity (Fig. S5). The presence of a ligand markedly decreased the average density of buried water molecules. Therefore, the binding cavity was suboptimally hydrated in the absence of a ligand, and nearly dehydrated in the presence of OCT. To assess the energetic properties of buried water molecules, the non-bonded energies were calculated following the approach used by Young et al. [9]. The properties of water molecules in the bulk solvent were also calculated. According to the data in Table 2, water molecules in the bulk solvent had a markedly more negative potential energy ( $E_{pot}$ ) and formed more hydrogen bonds ( $N_{hb}$ ) than the water molecules inside the binding pocket. In turn, the external water molecules showed a considerably more favorable electrostatic energy ( $E_{elec}$ ) and a more unfavorable van der Waals energy ( $E_{vdw}$ ) than the internal water molecules. Regarding the buried water molecules, as both  $N_{hb}$  and

**Table 2**  
Residual hydration inside the binding pocket determined from MD simulations<sup>d</sup>.

	$\overline{N_w}$	$V^b$ ( $\text{\AA}^3$ )	$\rho_w$ ( $N_w/\text{\AA}^3 \times 10^{-3}$ )	$N_{hb}$	$E_{pot}$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$E_e$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$E_{vdw}$ (kcal mol <sup>-1</sup> )
H <sub>2</sub> O (bulk)	–	–	33 <sup>c</sup>	3.5 ± 0.9	–19.6 ± 0.2	–22.4 ± 0.2	2.8 ± 0.1
bOBP	6.9 ± 1.0	462 ± 63	14.9 ± 2.1	2.3 ± 0.9	–16.0 ± 0.4	–16.8 ± 0.4	0.8 ± 0.2
bOBP <sub>121G+</sub>	7.6 ± 2.9	447 ± 50	17.0 ± 6.5	2.5 ± 0.9	–16.8 ± 0.2	–17.6 ± 0.2	1.0 ± 0.2
bOBP <sub>121G+</sub> -HEX	2.3 ± 0.4	422 ± 69	5.5 ± 2.1	2.1 ± 0.6	–15.6 ± 0.1	–15.2 ± 0.4	–0.4 ± 0.4
bOBP <sub>121G+</sub> -OCT <sup>d</sup>	0.2 ± 0.5	430 ± 41	0.5 ± 0.1	1.4 ± 1.0	–10.0 ± 1.8	–8.2 ± 2.3	–1.8 ± 0.2

<sup>a</sup> Energy values correspond to the so-called world energies [9], which are the difference in energy between the system with and without the indicated number of water molecules inside the binding pocket. The energies for a given  $N_w$  value were calculated as the weighted average from the properties of cumulative trajectory segments corresponding to three integer  $N_w$  values around the average value (for example, the properties for trajectory segments with  $N_w = 6, 7, 8$  were averaged to yield the overall properties for bOBP).

<sup>b</sup> Average binding pocket volume throughout the MD simulation. In the case of the protein-ligand complexes, the volume of the ligand (HEX:  $115 \pm 3 \text{\AA}^3$ , OCT:  $149 \pm 3 \text{\AA}^3$ ) was subtracted from the total volume of the binding pocket.

<sup>c</sup> Experimental density of liquid water.

<sup>d</sup> On the average, OCT virtually displaced all water molecules from the binding cavity. For comparison purposes, the  $N_{hb}$  and energy values exhibited by a single water molecule inside the binding cavity occupied by OCT are shown.

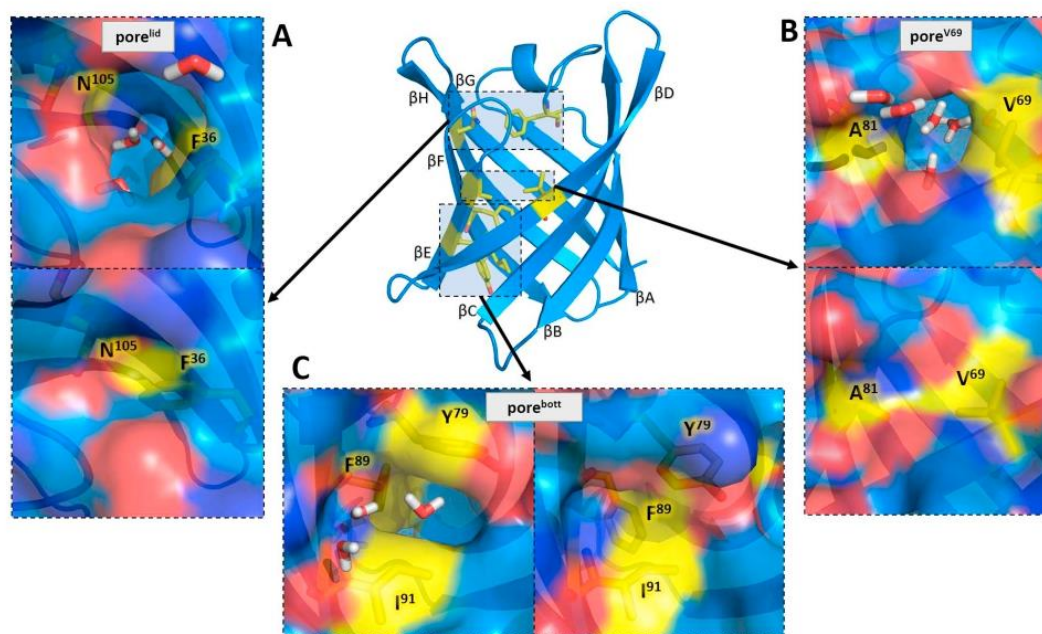
$\overline{N_w}$  decreased,  $E_{pot}$  and  $E_{elec}$  became less favorable, while  $E_{vdw}$  went from unfavorable to favorable. Overall, the trends that emerge from Table 2 indicate that buried water molecules had increasingly reduced non-bonded interactions as hydration of the binding cavity decreased. Therefore, the data suggest that the new interactions formed in the bulk solvent by water molecules expelled from the protein cavity contribute favorably to the overall binding enthalpy.

### 3.7. Exchange of water molecules occurred through several transient pores

A visual inspection of the MD trajectories revealed that the exchange of water molecules between the binding cavity of bOBP and the surrounding solvent was a dynamic process that occurred through three transient pores that are exposed to the solvent (Fig. 6). Two of the pores were spotted near the top of the  $\beta$ -barrel, while the other one was observed at the bottom of the binding cavity. In the apo forms of bOBP

and bOBP<sub>121G+</sub>, virtually all the opening events of the three pores occurred coupled to the transit of water molecules. In contrast, the presence of a ligand in the binding cavity elicited distinctly different effects on the opening activity and exchange of water molecules of each pore.

The opening of one of the pores at the top of the  $\beta$ -barrel, pore<sup>lid</sup>, correlated with the rotation of the sidechain of F<sup>36</sup> (Fig. 6A). Pore<sup>lid</sup> was seen in open conformation 7 and 4 times in apo bOBP and bOBP<sub>121G+</sub>, respectively, while no opening events were observed in the presence of any of the ligands (Fig. S6). This slowdown in the dynamics of F<sup>36</sup> induced by the ligands agrees with that already observed in a 20 ns-long MD simulation of the triple mutant bOBP<sub>GCC</sub> [66]. The opening of the other transient pore at the top of the  $\beta$ -barrel, pore<sup>v69</sup>, also correlated with the rotation of a single residue, V<sup>69</sup> (Fig. 6B). Pore<sup>v69</sup> was the most active pore (Fig. S7), undergoing 26 and 116 opening events in apo bOBP and bOBP<sub>121G+</sub>, respectively. The presence of a ligand elicited an



**Fig. 6.** Schematic representation of the three spots on the  $\beta$ -barrel surface that opened spontaneously to allow the transit of water molecules to and from the binding cavity during the MD simulations. The opening of the two pores at the top of the  $\beta$ -barrel, pore<sup>lid</sup> (A) and pore<sup>v69</sup> (B), depended mainly on the rotation of the sidechain of a single residue, F<sup>36</sup> and V<sup>69</sup>, respectively, while the opening of the pore at the bottom of the binding cavity, pore<sup>bott</sup> (C), depended on the synchronous opening of two layers defined by residues F<sup>89</sup>-Y<sup>79</sup> and I<sup>91</sup>-Y<sup>79</sup>. Trajectory snapshots are presented in which each pore is observed in an open or closed conformation.



increase of ~60% in the opening frequency of pore<sup>V69</sup>. Inspection of the trajectories revealed, however, that the ligand prevented the transit of water molecules in ~90% of the opening events. The pore observed close to the bottom of the binding cavity, pore<sup>bo</sup>, was the biggest detected in the simulations (Fig. 6C). The opening of pore<sup>bo</sup> occurred when an inner and an outer layer opened simultaneously (Fig. S8). The inner layer was formed by F<sup>89</sup> and Y<sup>79</sup>, while the outer layer was formed by I<sup>91</sup> and Y<sup>79</sup>. Pore<sup>bo</sup> opened 7–8 times in the apo bOBP and in both bOBP<sub>121G+</sub> complexes, and 16 times in apo bOBP<sub>121G+</sub>. The conformational transitions of F<sup>36</sup>, V<sup>69</sup> or Y<sup>79</sup>, F<sup>89</sup>, I<sup>91</sup> did not involve any strong structural deformation of the  $\beta$ -barrel. A further description of the conformational changes associated with the transient opening of the three pores is presented in the accompanying text of Figs. S6–S8.

### 3.8. Transient pores may act as gateways for ligand entry into the binding pocket

Finally, to explore whether any of the pores can act as a gateway for the entry of a ligand into the binding cavity, HEX and OCT were docked against a protein zone restricted to the vicinity of each pore in an open conformation. The majority of the ligand poses in the three pores showed the hydroxyl group exposed to the solvent and the aliphatic tail pointing inside the protein. The best ranked pose for each ligand in each pore was submitted to a series of 10 independent unbiased simulations in explicit solvent, each 10 ns long. An example of the immersion process of OCT into the binding cavity is illustrated in Fig. S9. In all runs, OCT and HEX entered the binding cavity through pore<sup>id</sup> within the first ns of simulation. The same result was observed for OCT docked onto pore<sup>bo</sup>, while HEX reached inside the protein in four of the runs and fully immersed in the bulk solvent in the other six attempts. Regarding pore<sup>V69</sup>, it was crossed by OCT and HEX in eight and zero runs, respectively. It is worth mentioning that ligand entries caused a transient perturbation of the local secondary structure surrounding each pore. This observation parallels the picture that arose from the biased and mixed biased/free MD simulations of ligand association/dissociation carried out with porcine OBP (pOBP) and rat OBP variant 1F (rOBP-1F), in which the crossing of the ligand caused reversible deformations of  $\beta$ -strands and loops that are part of the top of the  $\beta$ -barrel [67–69].

## 4. Discussion

Unlike other small extracellular proteins, lipocalins lack a compact hydrophobic core [16]. Instead, the  $\beta$ -barrel encloses a large hydrophobic cavity that functions as the primary binding site for hydrophobic molecules. Although the calyx motif is highly conserved, members of the lipocalin family diverge largely in primary structure, ligand specificity, binding mode and, ultimately, biological function [12,16,70]. These factors could have resulted in diversified strategies to modulate ligand binding affinity and specificity. In this regard, we found it instructive to compare the binding thermodynamic signatures of bOBP, with those previously reported for mMUP-I and rOBP3. Despite a low sequence identity (~35% on the average), the three lipocalins share very similar 3D structures, have closed binding cavities and exhibit a non-classical hydrophobic effect in the interaction with their ligands. However, a comparison of the binding parameters as a function of ligand length revealed unexpectedly different behaviors. While the binding enthalpy and entropy of bOBP and mMUP-I decrease with each methylene group of the ligand (that is, they display a *specific non-classical hydrophobic* signature), the opposite is observed for rOBP3 (that is, it displays a *specific classical hydrophobic* signature). Moreover, bOBP shows more negative  $\Delta H_{CH_2}$  and  $\Delta S_{CH_2}$  values than mMUP-I. In relation to  $\Delta C_{p,CH_2}$ , bOBP has an almost null value, while mMUP-I shows a negative value that correspond to that expected for the desolvation of a methylene group.

The available data do not allow us to disentangle the determinants

of the different binding behaviors exhibited by bOBP, mMUP-I and rOBP3. Many factors, alone or in combination, could be responsible of such differences. For instance, the formation of a hydrogen bond in a highly hydrophobic cavity can yield a large favorable enthalpy [71]. However, OCT does not form any hydrogen bond in the crystal structure of bOBP [28], a feature that the MD simulations reproduced for both HEX and OCT. On the other hand, it is still unclear to what extent the order, abundance, and exchange regime of water molecules within the binding cavity vary among lipocalins. In the case of mMUP-I, a significant role of cavity desolvation in determining the ligand binding energetics has been ruled out [10,23]. Likewise, water <sup>17</sup>O and <sup>2</sup>H magnetic relaxation dispersion measurements on  $\beta$ -lactoglobulin led to the conclusion that the ligand-free cavity of this lipocalin, despite being open and therefore accessible to the solvent, is essentially dehydrated [19]. In contrast, it has been proposed that cavity desolvation contributes significantly to the ligand binding enthalpy of rOBP3, a concept that has also been invoked to rationalize the enthalpy-driven hydrophobic binding in other protein-ligand complexes and model systems [4,8–11,19,72,73]. However, neither the internal solvation of bOBP nor the response to ligand binding have been characterized [20]. The MD results obtained herein reveal that bOBP undergoes considerable, albeit suboptimal, internal solvation of the binding cavity. Internal solvation is governed by an active bidirectional communication between the binding cavity and the surrounding solvent that occurs in the sub-microsecond timescale through at least three pores that open transiently. The highly mobile water molecules inside the binding cavity have higher potential energy and poorer fulfillment of their hydrogen bonding potential than bulk water molecules, *i.e.*, their energetic properties should be positioned somewhere between the properties of liquid and gaseous water [72,74]. Water condensation is accompanied by large negative enthalpy and entropy changes and an increase in heat capacity. Therefore, the additional displacement of water molecules elicited by OCT in relation to HEX might contribute significantly to the distinctive  $\Delta X_{CH_2}$  values exhibited by bOBP in comparison to those exhibited by mMUP-I or rOBP3. To further test this scenario, a comprehensive computational investigation of the cavity solvation properties of lipocalins is clearly warranted.

The spontaneous opening of the  $\beta$ -barrel of bOBP was previously reported by Mazzini et al. [62], who observed the rotation of F<sup>36</sup> and Y<sup>83</sup> in a free MD simulation carried out with a single protomer at 53 °C. The rotation of these residues was observed later in a simulation of bOBP<sub>GCC</sub> [66]. Unlike those reports, no conformational change of Y<sup>83</sup> was observed in any of our MD trajectories. Spontaneous exposure of the binding cavity has also been observed for pOBP and rOBP-1F through the transient breaking of the hydrogen bond network between  $\beta$ -strands D and E [67], and for pOBP through the rotation of Y<sup>82</sup> [75]. Nevertheless, none of those *in silico* studies reported the transit of water molecules to or from the lipocalin interior. It is not clear whether the absence of internal solvation in those lipocalins is due to the fact that they have less propensity than bOBP to sequester water molecules inside the binding cavity, or simply because too short of a time simulation was spanned ( $\leq 20$  ns). Regarding the route for ligand entry, docking experiments followed by unrestrained MD simulations showed that any of the pores can allow transit of the ligand into the binding cavity of bOBP. However, pore<sup>id</sup> was the most prone to allow ligand entry into the protein cavity. In agreement with that result, biased MD studies of pOBP and rOBP-1F suggest that ligand association/dissociation may occur through a pathway that involves a region close to F<sup>36</sup> and Y<sup>83</sup> (F<sup>35</sup>/Y<sup>82</sup> numeration in pOBP) [67–69,75].

Despite the increasing number of lipocalins that are known to form homo-oligomers [65,76–82], the effect of the quaternary state on ligand binding and biological function has scarcely been studied in this family [18,78,79,83–86]. bOBP forms homodimers, although it is the only known lipocalin that self-associates through a domain swapping mechanism [87–90]. Therefore, a comparative study of this lipocalin and its monomeric mutant was performed to address the possible interplay



between ligand binding and subunit communication. Calorimetric measurements disclosed, however, that bOBP and bOBP<sub>121G+</sub> share the same ligand-binding equilibrium and kinetic parameters. In line with that, the two proteins exhibited the same overall  $\beta$ -barrel conformation and internal hydration properties. The independence between the subunits is also manifested in the high thermostability of bOBP<sub>121G+</sub> and the monomerized subunits of bOBP. The rather modest improvement in thermal stability elicited by domain swapping is consistent with the slightly higher resistance of bOBP to chaotropic agents compared to bOBP<sub>121G+</sub> [63]. In this regard, it is interesting to recall that diverse protein-engineering studies have shown that domain swapping can be achieved or abolished by relatively minor changes in the length of the hinge loop [90,91]. In addition, it is not unusual for natural domain-swapped dimers to exhibit dissociation constants in the micromolar to the millimolar range, while the interconversion between monomers and dimers is a slow process [90,91]. Similarly, our data, in conjunction with published results [38–40], indicate that domain swapping in bOBP does not substantially modify the structural stability of the  $\beta$ -barrel motif, but it does create a large kinetic barrier that separates stable monomeric and dimeric subunits. It is still unclear whether this property represents an advantage for the *in vivo* function of bOBP.

## 5. Concluding remarks

Because of the enormous variability of primary structures within the lipocalin family, it is not surprising to find among its members distinctly different energetic strategies to achieve affinity and selectivity for their natural ligands. Like other lipocalins, bOBP exhibits a non-classical hydrophobic effect in the interaction with its ligands. For members of other protein families, it has been proposed that the expulsion of high-energy water molecules from the binding cavity to the bulk solvent contributes substantially to the enthalpy change that drives the recognition of hydrophobic ligands (for a recent review, see ref. [73]). In the case of bOBP, MD simulations disclosed that the binding cavity is solvated suboptimally. The ligand-induced displacement of solvent molecules from the hydrophobic cavity is consistent with the fact that bOBP exhibits distinctive energetic properties with respect to other lipocalins. The internal solvation of bOBP is governed by a frequent exchange of water molecules that occurs through several transient tunnels or pores; a property that, as far as we know, has not been documented for any other lipocalin. Overall, our combined discussion of experimental and computational results sheds new light on the energetics and molecular mechanism of lipocalin binding, highlighting the role that internal water molecules play in the recognition process.

## Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Acknowledgements

Homero Gómez-Velasco is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship No. 290337 from CONACyT, México. We thank Dr. Patricia Cano-Sánchez for the technical support in the production of the recombinant proteins. This work was financed in part by DGAPA, UNAM [PAPIIT IN205018] and CONACyT [Grant 235831]. Computer support and GPU time for the simulations were facilitated in part by DGTIC, UNAM [LANCAD-UNAM-DGTIC-213].

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2019.106315>.

## References

- [1] H.S. Frank, M.W. Evans, Free volume and entropy in condensed systems III entropy in binary liquid mixtures; partial Molal entropy in dilute solutions; structure and thermodynamics in aqueous electrolytes, *J. Chem. Phys.* 13 (1945) 507–532.
- [2] C. Tanford, How protein chemists learned about the hydrophobic factor, *Protein Sci.* 6 (1997) 1358–1366.
- [3] J.D. Dunitz, The entropic cost of bound water in crystals and biomolecules, *Science* 264 (80) (1994) 670.
- [4] J. Seelig, P. Ganz, Nonclassical hydrophobic effect in membrane binding equilibria, *Biochemistry* 30 (1991) 9354–9359.
- [5] P.W. Snyder, J. Mecinovic, D.T. Moustakas, S.W. Thomas, M. Harder, E.T. Mack, M.R. Lockett, A. Héroux, W. Sherman, G.M. Whitesides, Mechanism of the hydrophobic effect in the biomolecular recognition of arylsulfonamides by carbonic anhydrase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (2011) 17889–17894.
- [6] M. Fernández-Vidal, S.H. White, A.S. Ladokhin, Membrane partitioning: “classical” and “nonclassical” hydrophobic effects, *J. Membr. Biol.* 239 (2011) 5–14.
- [7] B.K. Paul, N. Ghosh, S. Mukherjee, Interaction of bile salts with  $\beta$ -Cyclodextrins reveals nonclassical hydrophobic effect and enthalpy–entropy compensation, *J. Phys. Chem. B* 120 (2016) 3963–3968.
- [8] B.J. Berne, J.D. Weeks, R. Zhou, Dewetting and hydrophobic interaction in physical and biological systems, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 60 (2009) 85–103.
- [9] T. Young, R. Abel, B. Kim, B.J. Berne, R.A. Friesner, Motifs for molecular recognition exploiting hydrophobic enclosure in protein-ligand binding, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 808–813.
- [10] S.W. Homans, Water, water everywhere — except where it matters? *Drug Discov. Today* 12 (2007) 534–539.
- [11] P. Setny, R. Baron, J.A. McCammon, How can hydrophobic association be enthalpy driven? *J. Chem. Theory Comput.* 6 (2010) 2866–2871.
- [12] D.R. Flower, The lipocalin protein family: structure and function, *Biochem. J.* 318 (Pt 1) (1996) 1–14.
- [13] M. Gebauer, A. Skerra, Anticalins: Small engineered binding proteins based on the lipocalin scaffold, *Methods Enzymol.* 2012, pp. 157–188.
- [14] J.M. Crowther, G.B. Jameson, R.C.J. Hodgkinson, Alison J. Dobson, Structure, oligomerization and interactions of  $\beta$ -lactoglobulin, in: I. Gligli (Ed.), *Milk Proteins - From Struct. to Biol. Prop. Heal. Asp.*, IntechOpen, 2016, pp. 33–50.
- [15] S. Kume, Y.-H. Lee, M. Nakatsuji, Y. Teraoka, K. Yamaguchi, Y. Goto, T. Inui, Fine-tuned broad binding capability of human lipocalin-type prostaglandin D synthase for various small lipophilic ligands, *FEBS Lett.* 588 (2014) 962–969.
- [16] B. Akerstrom, D.R. Flower, J.P. Salier, Lipocalins: unity in diversity, *Biochim. Biophys. Acta* 1482 (2000) 1–8.
- [17] L. Charlier, C. Nespolous, S. Fiorucci, S. Antonczak, J. Golebowski, Binding free energy prediction in strongly hydrophobic biomolecular systems, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 9 (2007) 5761.
- [18] M. Bello, M.J. Fragoso-Vázquez, J. Correa Basurto, Energetic and conformational features linked to the monomeric and dimeric states of bovine BLG, *Int. J. Biol. Macromol.* 92 (2016) 625–636.
- [19] J. Qvist, M. Davidovic, D. Hamelberg, B. Halle, A dry ligand-binding cavity in a solvated protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 6296–6301.
- [20] K.L. Portman, J. Long, S. Carr, L. Briand, D.J. Winzor, M.S. Searle, D.J. Scott, Enthalpy/entropy compensation effects from cavity desolvation underpin broad ligand binding selectivity for rat odorant binding protein 3, *Biochemistry* 53 (2014) 2371–2379.
- [21] N.R. Syme, C. Dennis, A. Bronowska, G.C. Paesen, S.W. Homans, Comparison of entropic contributions to binding in a “hydrophilic” versus “hydrophobic” ligand–protein interaction, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 8682.
- [22] M.V. Novotny, M.J. Stone, L. Zidek, Increased protein backbone conformational entropy upon hydrophobic ligand binding, *Nat. Struct. Biol.* 6 (1999) 1118–1121.
- [23] J. Roy, C.A. Laughton, Long-timescale molecular-dynamics simulations of the major urinary protein provide atomistic interpretations of the unusual thermodynamics of ligand binding, *Biophys. J.* 99 (2010) 218–226.
- [24] R.J. Bingham, J.B.C. Findlay, S.-Y. Hsieh, A.P. Kalverda, A. Kjellberg, C. Perazzolo, S.E.V. Phillips, K. Seshadri, C.H. Trinh, W.B. Turnbull, G. Bodenhausen, S.W. Homans, Thermodynamics of binding of 2-Methoxy-3-isopropylpyrazine and 2-Methoxy-3-isobutylpyrazine to the major urinary protein, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 1675–1681.
- [25] E. Barratt, R.J. Bingham, D.J. Warner, C.A. Laughton, S.E.V. Phillips, S.W. Homans, Van der Waals interactions dominate ligand–protein association in a protein binding site occluded from solvent water, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 11827–11834.
- [26] R. Malham, S. Johnstone, R.J. Bingham, E. Barratt, S.E.V. Phillips, C.A. Laughton, S.W. Homans, Strong Solute–Solute Dispersive Interactions in a Protein–Ligand Complex, (2005).
- [27] W. Takken, D.L. Kline, Carbon dioxide and 1-octen-3-ol as mosquito attractants, *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 5 (1989) 311–316.
- [28] R. Ramoni, F. Vincent, S. Grolli, V. Conti, C. Malosse, F.-D. Boyer, P. Nagnan-Le Meillour, S. Spinelli, C. Cambillau, M. Tegoni, The insect attractant 1-Octen-3-ol is the natural ligand of bovine odorant-binding protein, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 7150–7155.
- [29] F. Vincent, S. Spinelli, R. Ramoni, S. Grolli, P. Pelosi, C. Cambillau, M. Tegoni, Complexes of porcine odorant binding protein with odorant molecules belonging to different chemical classes, *J. Mol. Biol.* 300 (2000) 127–139.
- [30] J. Vidic, J. Grosclaude, R. Monnerie, M.-A. Persuy, K. Badonnel, C. Baly, M. Caillol, L. Briand, R. Saless, E. Pajot-Augy, On a chip demonstration of a functional role for odorant binding protein in the preservation of olfactory receptor activity at high odorant concentration, *Lab Chip* 8 (2008) 678.
- [31] P. Pelosi, A.M. Pisanelli, N.E. Baldaccini, A. Gagliardo, Binding of [<sup>3</sup>H]-2-isobutyl-3-methoxy-pyrazine to cow olfactory mucosa, *Chem. Senses* 6 (1981) 77–85.
- [32] M.Z. Papiz, L. Sawyer, E.E. Eliopoulos, A.C.T. North, J.B.C. Findlay, R. Sivaprasadarao, T.A. Jones, M.E. Newcomer, P.J. Kraulis, The structure of  $\beta$ -



- lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein, *Nature* 324 (1986) 383–385.
- [33] S.W. Cowan, M.E. Newcomer, T.A. Jones, Crystallographic refinement of human serum retinol binding protein at 2Å resolution, *Proteins Struct. Funct. Genet.* 8 (1990) 44–61.
- [34] M. Bello, E. García-Hernández, Ligand entry into the calyx of β-lactoglobulin, *Biopolymers* 101 (2014) 744–757.
- [35] M.A. Bianchet, G. Bains, P. Pelosi, J. Pevsner, S.H. Snyder, H.L. Monaco, L.M. Amzel, The three-dimensional structure of bovine odorant binding protein and its mechanism of odor recognition, *Nat. Struct. Biol.* 3 (1996) 934–939.
- [36] F. Vincent, R. Ramoni, S. Spinelli, S. Grolli, M. Tegoni, C. Cambillau, Crystal structures of bovine odorant-binding protein in complex with odorant molecules, *Eur. J. Biochem.* 271 (2004) 3832–3842.
- [37] M. Tegoni, R. Ramoni, E. Bignetti, S. Spinelli, C. Cambillau, Domain swapping creates a third putative combining site in bovine odorant binding protein dimer, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 3 (1996) 863–867.
- [38] R. Ramoni, F. Vincent, A.E. Ashcroft, P. Accornero, S. Grolli, C. Valencia, M. Tegoni, C. Cambillau, Control of domain swapping in bovine odorant-binding protein, *Biochem. J.* 365 (2002) 739–748.
- [39] R. Ramoni, S. Spinelli, S. Grolli, V. Conti, E. Merli, C. Cambillau, M. Tegoni, Deswapping bovine odorant binding protein, *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics* 1784 (2008) 651–657.
- [40] A. Mazzini, A. Maia, M. Parisi, R.T. Sorbi, R. Ramoni, S. Grolli, R. Favilla, Reversible unfolding of bovine odorant binding protein induced by guanidinium hydrochloride at neutral pH, *Biochim. Biophys. Acta* 1599 (2002) 90–101.
- [41] M.C. Portillo-Téllez, M. Bello, G. Salcedo, G. Gutiérrez, V. Gómez-Vidales, E. García-Hernández, Folding and homodimerization of wheat germ agglutinin, *Biophys. J.* 101 (2011) 1423–1431.
- [42] P. Dumas, E. Ennifar, C. Da Veiga, G. Bec, W. Palau, C. Di Primo, A. Piñeiro, J. Sabin, E. Muñoz, J. Rial, Extending ITC to kinetics with kinITC, *Methods Enzymol.* 2016, pp. 157–180.
- [43] A. Piñeiro, E. Muñoz, J. Sabin, M. Costas, M. Bastos, A. Velázquez-Campoy, P.F. Garrido, P. Dumas, E. Ennifar, L. García-Río, J. Rial, D. Pérez, P. Fraga, A. Rodríguez, C. Cotel, AFFINImeter: a software to analyze molecular recognition processes from experimental data, *Anal. Biochem.* 577 (2019) 117–134.
- [44] D.A. Case, J.T. Berryman, R.M. Betz, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham III, T.A. Darden, R.E. Duke, T.J. Giese, H. Gohlke, A.W. Goetz, N. Homeyer, S. Izadi, P. Janowski, J. Kaus, A. Kovalenko, T.S. Lee, S. LeGrand, P. Li, T. Luchko, R. Luo, et al., AMBER 2014, University of California, San Francisco, 2014.
- [45] J. Wang, R.M. Wolf, J.W. Caldwell, P.A. Kollman, D.A. Case, Development and testing of a general amber force field, *J. Comput. Chem.* 25 (2004) 1157–1174.
- [46] R. Anandakrishnan, B. Aguilera, A.V. Onufriev, H++ 3.0: automating pK prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulations, *Nucleic Acids Res.* 40 (2012) W537–W541.
- [47] D. Alvarez-García, X. Barril, Molecular simulations with solvent competition quantify water displacability and provide accurate interaction maps of protein binding sites, *J. Med. Chem.* 57 (2014) 8530–8539.
- [48] D.R. Roe, T.E. Cheatham, PTRAJ and CPPTRAJ: software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data, *J. Chem. Theory Comput.* 9 (2013) 3084–3095.
- [49] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, VMD: visual molecular dynamics, *J. Mol. Graph.* 14 (1996) 33–38.
- [50] V. Le Guilloux, P. Schmidtke, P. Tuffery, Fpocket: an open source platform for ligand pocket detection, *BMC Bioinform.* 10 (2009) 168.
- [51] O. Trott, A.J. Olson, AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading, *J. Comput. Chem.* 31 (2010) 455–461.
- [52] The PyMOL Molecular Graphics System, Version 18, Schrödinger, LLC, 2019.
- [53] S.-Y. Sheu, D.-Y. Yang, H.L. Selzle, E.W. Schlag, Energetics of hydrogen bonds in peptides, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 12683–12687.
- [54] J. Pevsner, V. Hou, A.M. Snowman, S.H. Snyder, Odorant-binding protein characterization of ligand binding, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 6118–6125.
- [55] O.V. Stepanenko, O.V. Stepanenko, M. Staiano, I.M. Kuznetsova, K.K. Turoverov, S. D'Auria, The quaternary structure of the recombinant bovine odorant-binding protein is modulated by chemical denaturants, *PLoS One* 9 (2014) e85169.
- [56] A. Marabotti, A. Scirè, M. Staiano, R. Crescenzo, V. Aurilia, F. Tanfani, S. D'Auria, Wild-type and mutant bovine odorant-binding proteins to probe the role of the quaternary structure organization in the protein thermal stability, *J. Proteome Res.* 7 (2008) 5221–5229.
- [57] N.R. Syme, C. Dennis, S.E.V. Phillips, S.W. Homans, Origin of heat capacity changes in a “nonclassical” hydrophobic interaction, *ChemBiochem* 8 (2007) 1509–1511.
- [58] G.I. Makhatadze, P.L. Privalov, Heat capacity of proteins: I Partial molar heat capacity of individual amino acid residues in aqueous solution: hydration effect, *J. Mol. Biol.* 213 (1990) 375–384.
- [59] E.A. Chavelas, E. García-Hernández, Heat capacity changes in carbohydrates and protein-carbohydrate complexes, *Biochem. J.* 420 (2009) 239–247.
- [60] J.I. Loch, A. Polit, P. Bonarek, D. Olszewska, K. Kurpiewska, M. Dziejzicka-Wasylińska, K. Lewiński, Structural and thermodynamic studies of binding saturated fatty acids to bovine β-lactoglobulin, *Int. J. Biol. Macromol.* 50 (2012) 1095–1102.
- [61] M. Rovoli, T. Thireou, Y. Choiset, T. Haertlé, L. Sawyer, E. Eliopoulos, G. Kontopidis, Thermodynamic, crystallographic and computational studies of non-mammalian fatty acid binding to bovine β-Lactoglobulin, *Int. J. Biol. Macromol.* 118 (2018) 296–303.
- [62] A. Mazzini, E. Polverini, M. Parisi, R. Sorbi, R. Favilla, Dissociation and unfolding of bovine odorant binding protein at acidic pH, *J. Struct. Biol.* 159 (2007) 82–91.
- [63] O.V. Stepanenko, D.O. Roginskii, O.V. Stepanenko, I.M. Kuznetsova, V.N. Uversky, K.K. Turoverov, Structure and stability of recombinant bovine odorant-binding protein: II unfolding of the monomeric forms, *PeerJ* 4 (2016) e1574.
- [64] V.A. Parsegian, R.P. Rand, D.C. Rau, Macromolecules and water: probing with osmotic stress, *Methods Enzymol.* 259 (1995) 43–94.
- [65] M. Bello, G. Pérez-Hernández, D.A. Fernández-Velasco, R. Arreguín-Espinosa, E. García-Hernández, Energetics of protein homodimerization: effects of water sequestering on the formation of β-lactoglobulin dimer, *Proteins* 70 (2008) 1475–1487.
- [66] E. Polverini, P. Lardi, A. Mazzini, R.T. Sorbi, C. Virna, R. Ramoni, R. Favilla, Characterization of a Deswapped triple mutant bovine odorant binding protein, *Int. J. Mol. Sci.* 12 (2011) 2294–2314.
- [67] E. Hajjar, D. Perahia, H. Débat, C. Nespoulous, C.H. Robert, Odorant binding and conformational dynamics in the odorant-binding protein, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 29929–29937.
- [68] J. Golebiowski, S. Antonczak, S. Fiorucci, D. Cabrol-Bass, Mechanistic events underlying odorant binding protein chemoreception, *Proteins* 67 (2007) 448–458.
- [69] P.N.-L. Meillour, P. Lagant, J.-P. Cornard, F. Brimau, C. Le Danvic, G. Vergoten, J.-C. Michalski, Phenylalanine 35 and tyrosine 82 are involved in the uptake and release of ligand by porcine odorant-binding protein, *Biochim. Biophys. Acta* 1794 (2009) 1142–1150.
- [70] B. Lakshmi, M. Mishra, N. Srinivasan, G. Archunan, Structure-based phylogenetic analysis of the Lipocalin superfamily, *PLoS One* 10 (2015) e0135507.
- [71] J. Gao, D.A. Bosco, E.T. Powers, J.W. Kelly, Localized thermodynamic coupling between hydrogen bonding and microenvironment polarity substantially stabilizes proteins, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16 (2009) 684–690.
- [72] R. Baron, P. Setny, J.A. McCammon, Water in cavity—ligand recognition, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 12091–12097.
- [73] E. Persch, O. Dumele, F. Diederich, Molecular recognition in chemical and biological systems, *Angew. Chem. Int. Ed.* 54 (2015) 3290–3327.
- [74] J.A. Ernst, R.T. Chubb, H.X. Zhou, A.M. Gronenberg, G.M. Clore, Demonstration of positionally disordered water within a protein hydrophobic cavity by NMR, *Science* 267 (1995) 1813–1817.
- [75] J. Golebiowski, S. Antonczak, D. Cabrol-Bass, Molecular dynamics studies of odorant binding protein free of ligand and complexed to pyrazine and octenol, *J. Mol. Struct. THEOCHEM* 763 (2006) 165–174.
- [76] R. Huber, M. Schneider, O. Epp, I. Mayr, A. Messerschmidt, J. Pflugrath, H. Kayser, Crystallization, crystal structure analysis and preliminary molecular model of the Bilin binding protein from the insect *Pieris brassicae*, *J. Mol. Biol.* 195 (1987) 423–434.
- [77] O.K. Gasyimov, A.R. Abduragimov, P. Merschak, B. Redl, B.J. Glasgow, Oligomeric state of lipocalin-1 (LCN1) by multiangle laser light scattering and fluorescence anisotropy decay, *Biochim. Biophys. Acta* 1774 (2007) 1307–1315.
- [78] D. Sanchez, S. Ortega-Cubero, B. Åkerström, M. Herrera, M.J. Bastiani, M.D. Ganfornina, Molecular interactions of the neuronal GPI-anchored lipocalin Lazarillo, *J. Mol. Recognit.* 21 (2008) 313–323.
- [79] C. Jobichen, A.Z. Fernandis, A. Velazquez-Campoy, K.Y. Leung, Y.-K. Mok, M.R. Wenk, J. Sivaraman, Identification and characterization of the lipid-binding property of GrlR, a locus of enterocyte effacement regulator, *Biochem. J.* 420 (2009) 191–201.
- [80] M.H. Niemi, M. Rytönen-Nissinen, I. Miettinen, J. Jänis, T. Virtanen, J. Rouvinen, Dimerization of lipocalin allergens, *Sci. Rep.* 5 (2015) 13841.
- [81] C.S. Kielkopf, J.K.K. Low, Y.-F. Mok, S. Bhatia, T. Palasovski, A.J. Oakley, A.E. Whitten, B. Garner, S.H.J. Brown, Identification of a novel tetrameric structure for human apolipoprotein-D, *J. Struct. Biol.* 203 (2018) 205–218.
- [82] L. Anghel, A. Rogachev, A. Kuklin, R.V. Erhan, β-Lactoglobulin associative interactions: a small-angle scattering study, *Eur. Biophys. J.* 48 (2019) 285–295.
- [83] M. Bello, G. Gutiérrez, E. García-Hernández, Structure and dynamics of β-lactoglobulin in complex with dodecyl sulfate and laurate: a molecular dynamics study, *Biophys. Chem.* 165–166 (2012) 79–86.
- [84] G. Gutiérrez-Magdaleno, M. Bello, M.C. Portillo-Téllez, A. Rodríguez-Romero, E. García-Hernández, Ligand binding and self-association cooperativity of β-lactoglobulin, *J. Mol. Recognit.* 26 (2013) 67–75.
- [85] M. Bello, Structural and energetic requirements for a second binding site at the dimeric β-lactoglobulin interface, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 34 (2016) 1884–1902.
- [86] E. García-Hernández, A. Hernández-Arana, R.A. Zubillaga, A. Rojo-Domínguez, Spectroscopic and thermodynamic evidence for a complex denaturation mechanism of bovine β-lactoglobulin A, *Biochem. Mol. Biol. Int.* 45 (1998) 761–768.
- [87] M.J. Bennett, M.P. Schlunegger, D. Eisenberg, 3D domain swapping: a mechanism for oligomer assembly, *Protein Sci.* 4 (1995) 2455–2468.
- [88] A.M. Gronenberg, Protein acrobatics in pairs — dimerization via domain swapping, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 19 (2009) 39–49.
- [89] M.A.B. Baker, R.M.G. Hynson, L.A. Ganuelas, N.S. Mohammadi, C.W. Liew, A.A. Rey, A.P. Duff, A.E. Whitten, C.M. Jeffries, N.J. Delalez, Y.V. Morimoto, D. Stock, J.P. Armitage, A.J. Turberfield, K. Namba, R.M. Berry, L.K. Lee, Domain-swap polymerization drives the self-assembly of the bacterial flagellar motor, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 23 (2016) 197–203.
- [90] F. Rousseau, J.W.H. Schymkowitz, L.S. Itzhaki, The unfolding story of three-dimensional domain swapping, *Structure* 11 (2003) 243–251.
- [91] N. Nandwani, P. Surana, H. Negi, N.M. Mascarenhas, J.B. Udgaonkar, R. Das, S. Gosavi, A five-residue motif for the design of domain swapping in proteins, *Nat. Commun.* 10 (2019) 452.

## Supplementary material

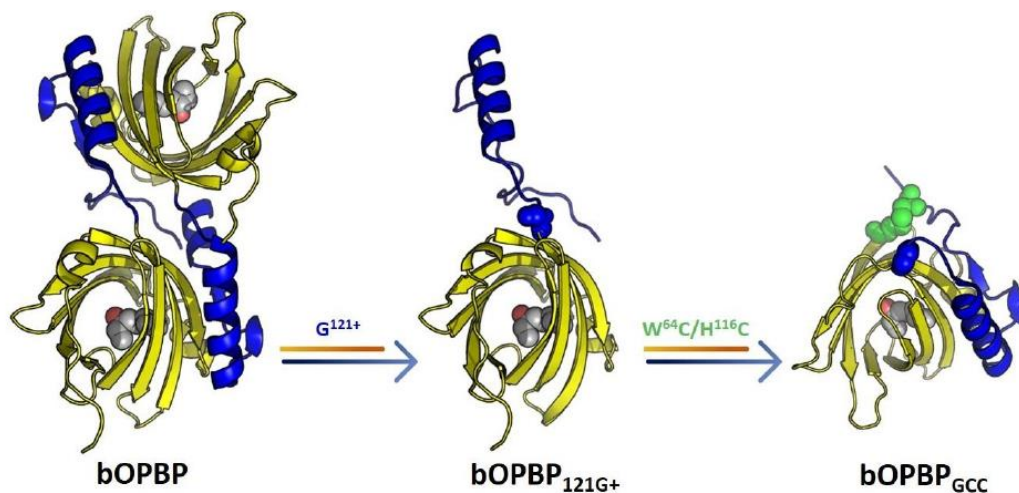
### **Enthalpically-driven ligand recognition and binding cavity hydration of bovine odorant binding protein**

Homero Gómez-Velasco<sup>1</sup>, Arturo Rojo-Domínguez<sup>2</sup> and Enrique García-Hernández<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Química, Ciudad Universitaria, Ciudad de México, 04510 and <sup>2</sup>Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Cuajimalpa. Departamento de Ciencias Naturales, México

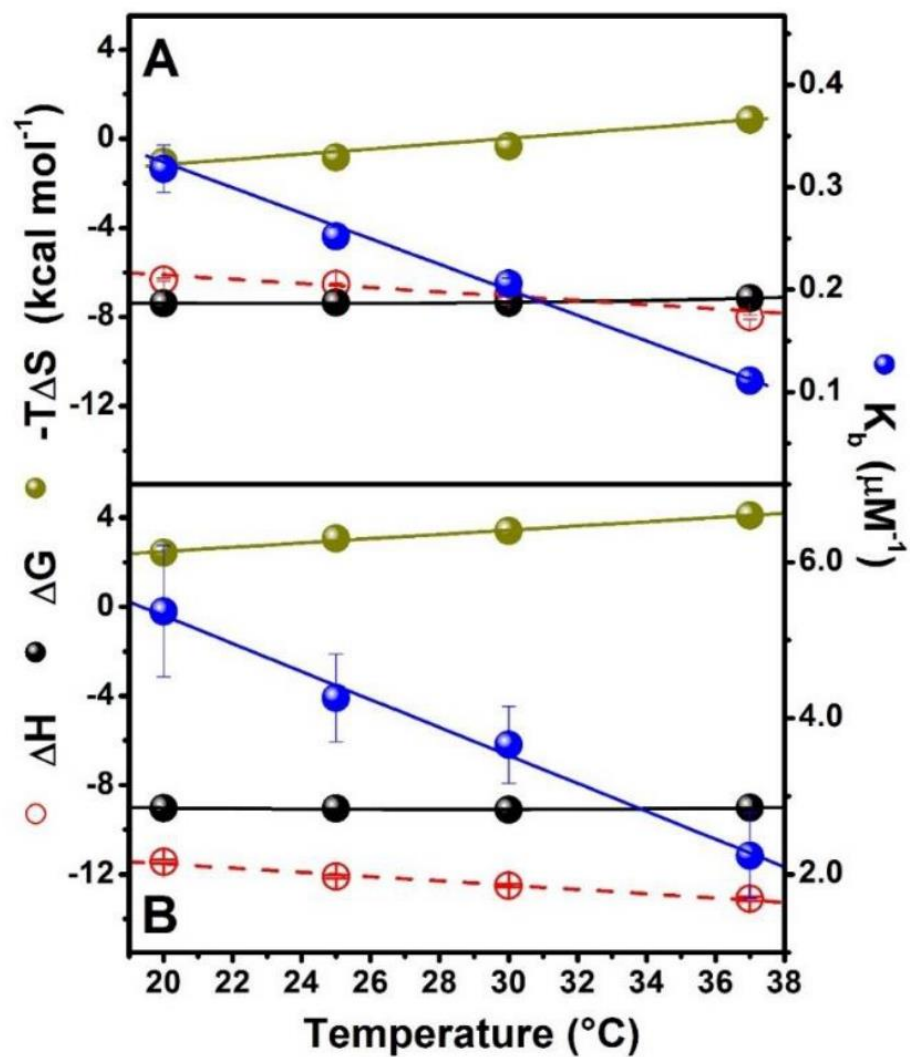
\*Corresponding author (e-mail: [egarciah@unam.mx](mailto:egarciah@unam.mx))

CORRESPONDING AUTHOR FOOTNOTE: Enrique García-Hernández, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Química, Ciudad Universitaria, Ciudad de México, 04510 México. Tel.: +52 55 56 22 44 24. Fax: +52 55 56 16 22 03

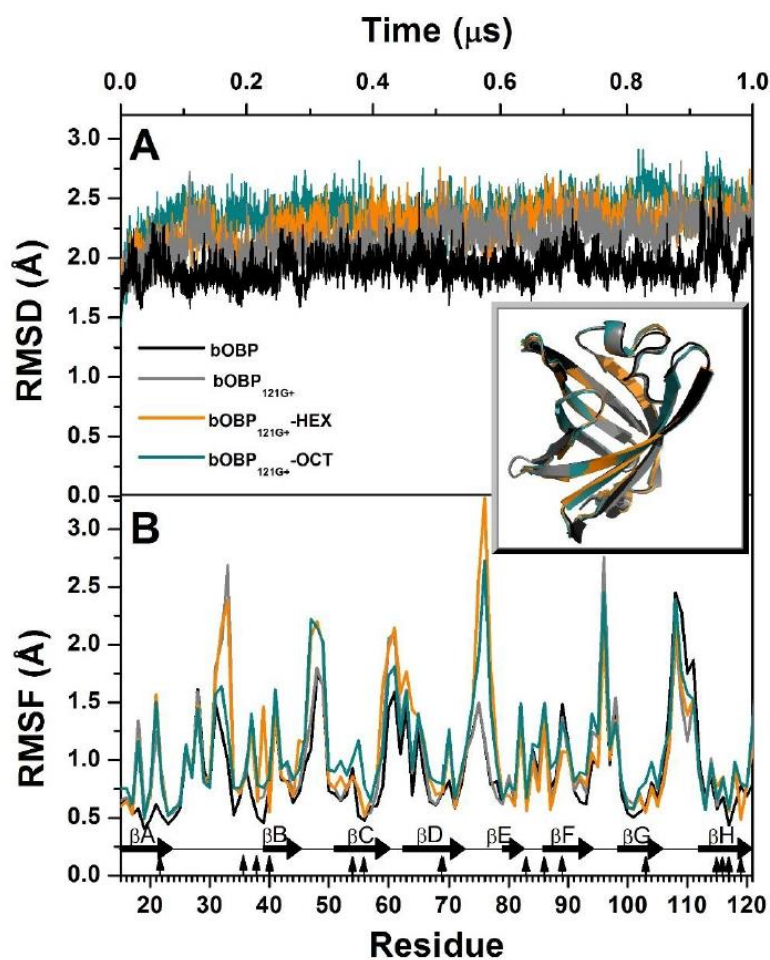


**Figure S1.** Schematic representation of the 3D structures of wild-type bOBP and its two engineered monomeric mutants, bOPB<sub>121G+</sub> and bOBP<sub>GCC</sub>. The insertion of a Gly (blue spheres) after position 121 produced bOPB<sub>121G+</sub>, a fully monomerized protein with its C-terminal region exposed to the solvent [1]. Additional mutations to replace W64 and H116 with Cys (green spheres) yielded the triple mutant bOBP<sub>GCC</sub>, which formed a disulfide bridge that packed the C-terminus against its own  $\beta$ -barrel [2]. The representations of bOBP and bOBP<sub>GCC</sub> were generated using PDB files 1g85 and 2h1v, respectively. The structure of bOPB<sub>121G+</sub> has not been solved experimentally. A model of this mutant was built in the present study, inserting a Gly residue in the corresponding position in the structure of wild-type bOBP. The residues corresponding to the swapping domain are in blue cartoons.

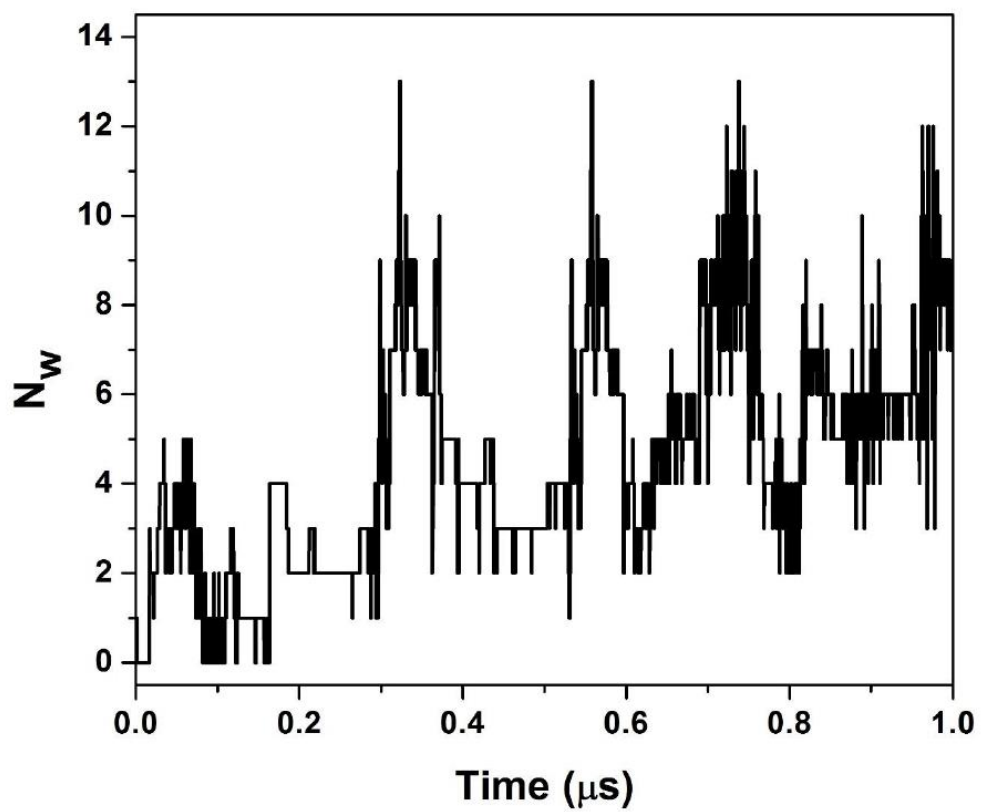




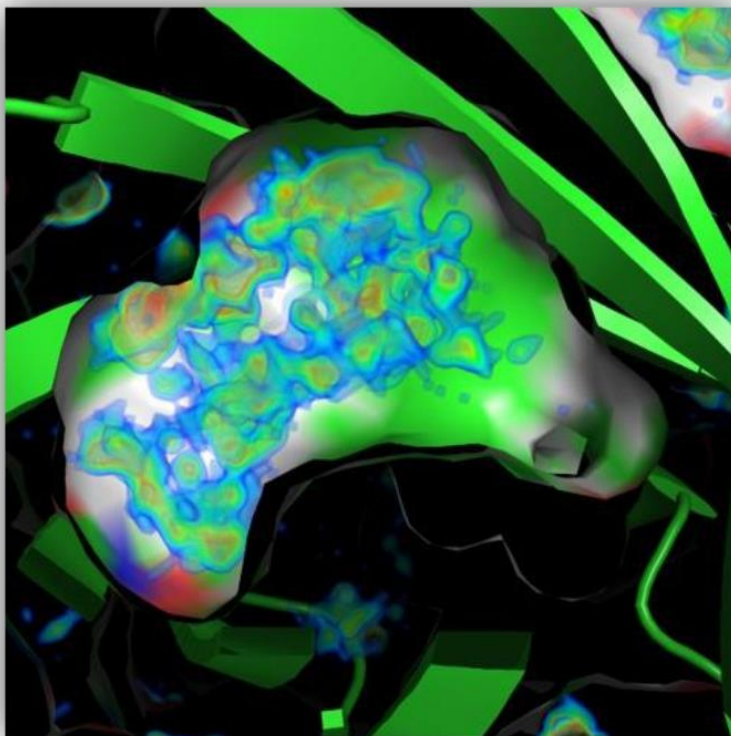
**Figure S2.** Thermodynamic binding parameters of bOBP<sub>121G+</sub> to HEX (A) and OCT (B) as a function of temperature. The red dashed lines correspond to the best fitting of a straight line to the enthalpy binding data. Measurements were performed in 0.02 M phosphate, 0.1 M NaCl, pH 7.4.



**Figure S3.** Structural fluctuations obtained from 1  $\mu\text{s}$ -long unbiased MD simulations in explicit solvent. **A)** RMSD as a function of time. **Inset:** Superposition of the average  $\beta$ -barrel structures resulting from each trajectory. The RMSD between the average structures was  $< 0.7 \text{ \AA}$ . **B)** RMSF values for  $C\alpha$  atoms. The average RMSF over the  $\beta$ -barrel motif (residues 15-121) of apo bOBP was  $0.9 \pm 0.4 \text{ \AA}$ , while that of apo bOBP<sub>121G+</sub> was  $1.0 \pm 0.4 \text{ \AA}$ . The average RMSF of the C-terminal region (residues 122-159) of bOBP was  $2.2 \pm 0.6 \text{ \AA}$ , while that of bOBP<sub>121G+</sub> was  $7.0 \pm 2.7 \text{ \AA}$ . Vertical arrows indicate the position of the residues that line the interior of the protein cavity; from left to right they correspond to: I<sup>22</sup>, F<sup>36</sup>, T<sup>38</sup>, F<sup>40</sup>, F<sup>54</sup>, F<sup>56</sup>, V<sup>69</sup>, Y<sup>83</sup>, N<sup>87</sup>, F<sup>89</sup>, N<sup>103</sup>, L<sup>115</sup>, T<sup>116</sup>, V<sup>119</sup>, G<sup>117</sup>. Horizontal arrows indicate the positions of the  $\beta$ -strands.



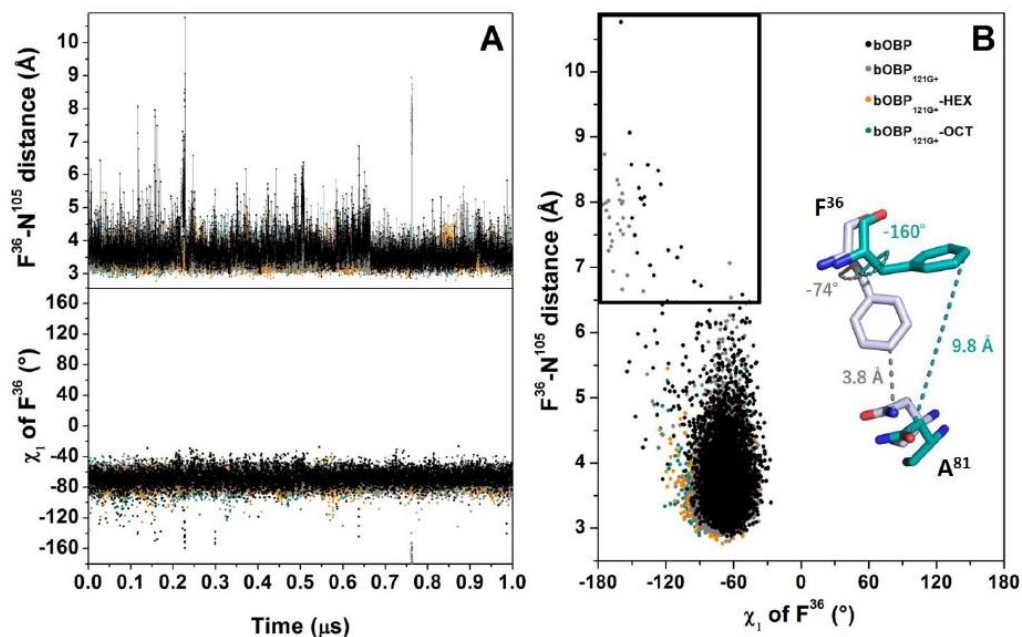
**Figure S4.** Time course of the number of water molecules inside the binding pocket ( $N_w$ ) of the second subunit of apo bOBP as determined from 1  $\mu$ s-long unrestrained MD trajectories.



**Figure S5.** Water density map in the ligand-free binding cavity of bOBP. Densities were calculated with the pyMDMIX suite [3] and rendered with the PYMOL program [4]. The color ramp goes from transparent blue at the lowest densities through cyan, green, yellow and finally red at the highest densities.

## Pore<sup>lid</sup>

In all the crystal structures of bOBP, F<sup>36</sup>, a residue located in the loop A-B, shows a single conformation defined by a  $\chi_1$  dihedral angle of  $\sim -75^\circ$ . F<sup>36</sup> kept that angle value during most of the simulation time. With this conformation, the aromatic ring of F<sup>36</sup> contacted the sidechain of N<sup>105</sup>, occluding the pore. In both apoproteins, sporadic rotation towards  $\chi_1 = -180^\circ$  moved F<sup>36</sup> away from N<sup>105</sup>, prompting the opening of the pore, and allowing the transit of solvent molecules. Pore<sup>lid</sup> remained closed throughout the simulations of the two complexes, while no rotation of F<sup>36</sup> was observed.

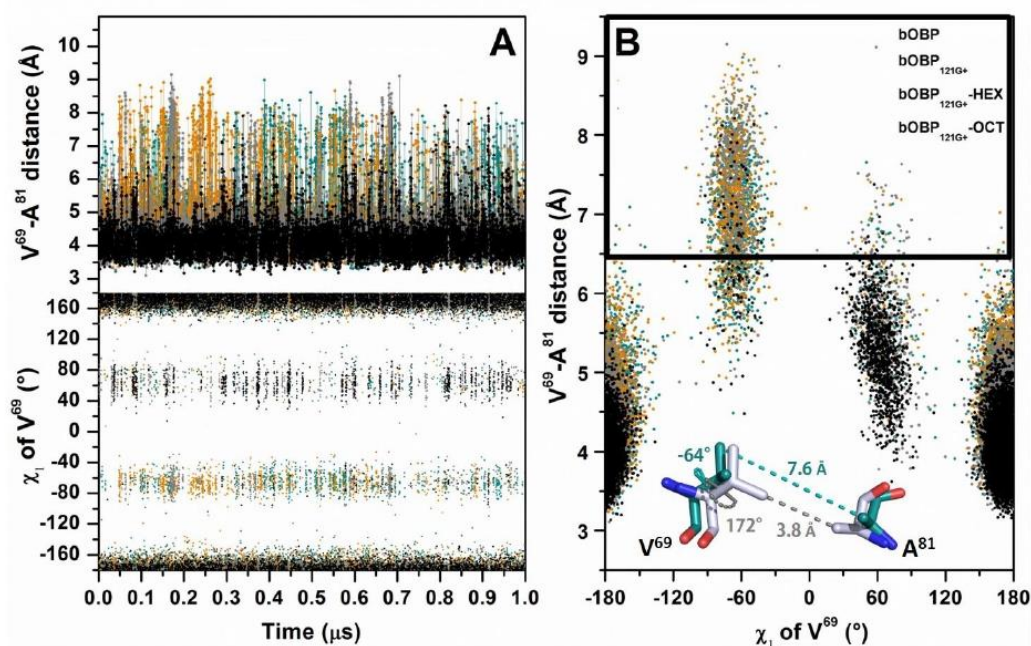


**Figure S6.** Opening activity of pore<sup>lid</sup>. **A)** Time courses of the distance between the C $\zeta$  atom of F<sup>36</sup> and N $\delta 2/O\delta 1$  of N<sup>105</sup> (**top**) and the dihedral angle  $\chi_1$  of F<sup>36</sup> (**bottom**). **B)** F<sup>36</sup>-N<sup>105</sup> distance as a function of the  $\chi_1$  angle of F<sup>36</sup>. Open and closed conformers are schematized as cyan and light-gray sticks, respectively. The rectangle delimits the region in which pore<sup>lid</sup> was open. Transit of water molecules through the pore was observed at F<sup>36</sup>-N<sup>105</sup> distances  $> 6.5$  Å.



## Pore<sup>V69</sup>

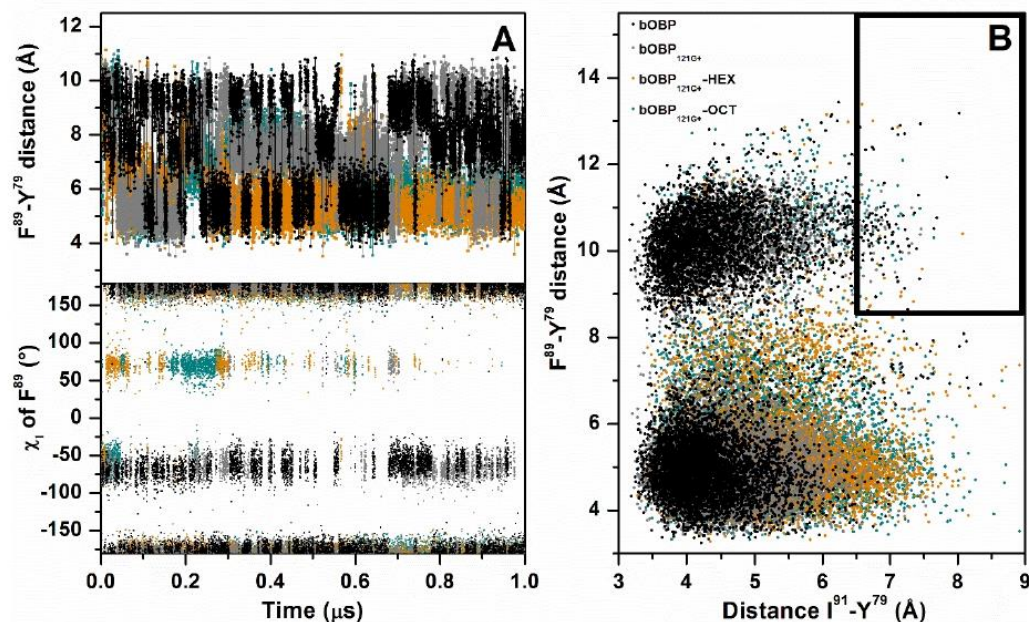
In the crystal structures of bOBP, the sidechain of V<sup>69</sup>, located in the middle of  $\beta$ -strand D, shows a constant conformation with  $\chi_1 \sim +170^\circ$ , contacting the methyl group of A<sup>81</sup>, located at the end of  $\beta$ -strand E. During the simulations, the rotation of V<sup>69</sup> at  $\chi_1 \sim -70^\circ$  elicited the opening of pore<sup>V69</sup>. V<sup>69</sup> populated a third conformer with  $\chi_1 \sim +70^\circ$ , upon which the pore was mostly occluded. The open/close transitions of pore<sup>V69</sup> were much more frequent than those of pore<sup>lid</sup>, and this frequency increased even more in the presence of a ligand molecule. As far as we know, there are no previous reports that indicate the participation of V<sup>69</sup> (or a residue occupying an equivalent position in other OBPs) as a door of any OBP binding cavity. However, our MD simulations showed that most of the exchange of water molecules occurred through pore<sup>V69</sup>. In fact, the higher opening frequency of this pore in bOBP<sub>121G+</sub> in relation to bOBP is consistent with the larger water exchange activity exhibited by the monomeric mutant.



**Figure S7.** Opening activity of pore<sup>V69</sup>. **A)** Time courses of the distance between the C $\gamma$ 1 atom of V<sup>69</sup> and C $\beta$  of A<sup>81</sup> (**top**) and the dihedral angle  $\chi_1$  of V<sup>69</sup> (**bottom**). **B)** V<sup>69</sup>-A<sup>81</sup> distance as a function of the  $\chi_1$  angle of V<sup>69</sup>. Open and closed conformers are schematized as cyan and light-gray sticks, respectively. The rectangle delimits the region in which pore<sup>V69</sup> was open. Transit of water molecules through the pore was observed at V<sup>69</sup>-A<sup>81</sup> distances > 6.5 Å. The fractions of simulation time in which pore<sup>V69</sup> in the open state were 0.008, 0.051, 0.080 and 0.078 for bOBP, bOBP<sub>121G+</sub>, bOBP<sub>121G+</sub>-HEX, and bOBP<sub>121G+</sub>-OCT, respectively.

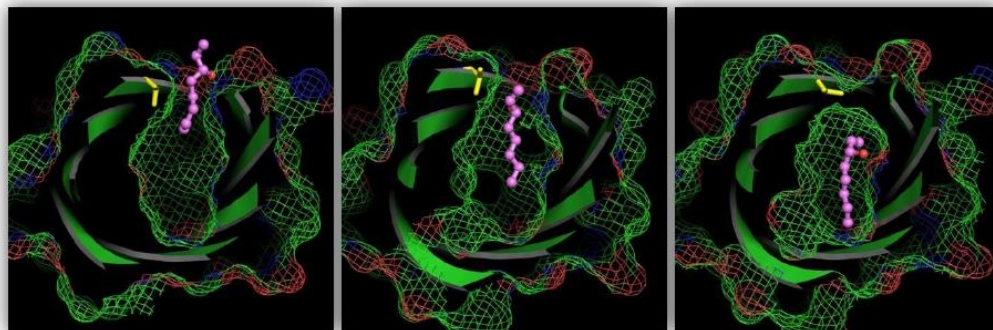
## Pore<sup>bott</sup>

The opening of pore<sup>bott</sup> occurred when an inner and an outer layer opened simultaneously. F<sup>89</sup>, located in the middle of  $\beta$ -strand F, is a residue that has been solved in two different conformations in the crystal structures of bOBP [5,6]. With a  $\chi_1$  value of  $\sim\pm 180^\circ$ , the aromatic ring of F<sup>89</sup> splits the binding cavity into a large and a small cavity, the latter about the size of a water molecule [7]. With a  $\chi_1$  value of  $\sim+70^\circ$ , a single continuous cavity is formed [6]. During all simulations, the conformer of  $\chi_1 \sim\pm 180^\circ$  was the most visited. The conformer with  $\chi_1 \sim+70^\circ$  was also visited, although more frequently in the two ligand complexes than in the apo proteins. The second most visited conformer in the apo forms had  $\chi_1 \sim-70^\circ$ , while it was much less visited in the two complexes. This last conformer, not seen in any bOBP crystal structure, separated the sidechain of F<sup>89</sup> from that of Y<sup>79</sup>, located in the middle of  $\beta$ -strand E, opening the inner layer of pore<sup>bott</sup>. Nevertheless, the transit of water molecules occurred only when the outer layer, formed by I<sup>91</sup> (in the middle of  $\beta$ -strand F) and Y<sup>79</sup>, was simultaneously open. The distancing of these residues was determined by rather subtle rearrangements of their mainchain and sidechain moieties, showing no clear correlation with any dihedral angle. As the opening activity of this layer was much more restricted than that of the inner layer, it represented the bottleneck for full opening of pore<sup>bott</sup>. The activity of the outer layer was scarcely modified by the presence of a ligand.



**Figure S8.** Opening activity of pore<sup>bott</sup>. **A)** Time courses of the distance between the C $\zeta$  atom of F<sup>89</sup> and C $\gamma$ 1 of Y<sup>79</sup> (**top**) and the dihedral angle  $\chi_1$  of F<sup>89</sup> (**bottom**). **B)** F<sup>89</sup>-Y<sup>79</sup> distance as a function of the I<sup>91</sup>(C $\delta$ 1)-Y<sup>79</sup>(C $\epsilon$ 1) distance. The rectangle delimits the region in which pore<sup>bott</sup> was open. Transit of water molecules through the pore was observed at F<sup>89</sup>-Y<sup>79</sup> and

I<sup>91</sup>-Y<sup>79</sup> distances >8.5 and >6.5 Å, respectively. The fraction of time that F<sup>89</sup> adopted  $\chi_1 \sim \pm 180^\circ$  (which splits the binding cavity into a large and a small cavity) was ~0.6-0.7 and ~0.7-0.8 in the apoproteins and in the two complexes, respectively. The conformer of F<sup>89</sup> with  $\chi_1 \sim -70^\circ$  was visited ~0.3-0.4 of the simulation time, while it was much less visited in the two complexes (<0.05). The conformer of F<sup>89</sup> with  $\chi_1 \sim +70^\circ$  was also more frequently visited in the two ligand complexes (~0.1) than in the apoproteins (<0.03).



**Figure S9.** Docking of OCT (balls and sticks) against bOBP followed by unbiased MD simulation in explicit solvent. The images illustrate the process of immersion of OCT into the binding cavity through pore<sup>V69</sup>. Residue V<sup>69</sup> is in yellow sticks. The starting structure was generated by docking OCT against pore<sup>V69</sup> in an open conformation, using the AutoDock Vina program [8]. The docked complex was submitted to an unrestrained MD simulation in explicit solvent. Within the first ns of simulation, OCT completely entered the binding cavity, after which pore<sup>V69</sup> closed spontaneously.



## References

- [1] R. Ramoni, F. Vincent, A.E. Ashcroft, P. Accornero, S. Grolli, C. Valencia, M. Tegoni, C. Cambillau, Control of domain swapping in bovine odorant-binding protein, *Biochem. J.*, 365 (2002) 739–48.
- [2] R. Ramoni, S. Spinelli, S. Grolli, V. Conti, E. Merli, C. Cambillau, M. Tegoni, Deswapping bovine odorant binding protein, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, 1784 (2008) 651–657.
- [3] D. Alvarez-Garcia, X. Barril, Molecular simulations with solvent competition quantify water displaceability and provide accurate interaction maps of protein binding sites, *J. Med. Chem.*, 57 (2014) 8530–8539.
- [4] The PyMOL Molecular Graphics System, Version 18, Schrödinger, LLC, n.d.
- [5] R. Ramoni, F. Vincent, S. Grolli, V. Conti, C. Malosse, F.-D. Boyer, P. Nagnan-Le Meillour, S. Spinelli, C. Cambillau, M. Tegoni, The Insect Attractant 1-Octen-3-ol Is the Natural Ligand of Bovine Odorant-binding Protein, *J. Biol. Chem.*, 276 (2001) 7150–7155.
- [6] F. Vincent, R. Ramoni, S. Spinelli, S. Grolli, M. Tegoni, C. Cambillau, Crystal structures of bovine odorant-binding protein in complex with odorant molecules, *Eur. J. Biochem.*, 271 (2004) 3832–3842.
- [7] M. Tegoni, R. Ramoni, E. Bignetti, S. Spinelli, C. Cambillau, Domain swapping creates a third putative combining site in bovine odorant binding protein dimer, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 3 (1996) 863–867.
- [8] O. Trott, A.J. Olson, AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading, *J. Comput. Chem.*, 31 (2010) 455–61.