



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

BASES ENERGÉTICAS DEL EFECTO HIDROFÓBICO NO CLÁSICO EN EL
RECONOCIMIENTO DE LIGANDOS APOLARES POR LA PROTEINA URINARIA MAYOR 1
DE *Mus musculus*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
JESUS ANTONIO RAUDA CEJA

TUTOR PRINCIPAL
DR. ENRIQUE GARCÍA HERNÁNDEZ
INSTITUTO DE QUÍMICA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. CARMEN NINA PASTOR COLÓN
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
DR. MARCELINO ARCINIEGA CASTRO
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

Ciudad de México. Abril, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

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 IN206221. Jesús Antonio Rauda Ceja recibió la beca de maestría 1019311, otorgada por CONACyT, y apoyo para la obtención de grado del proyecto PAPIIT IN206221.

DEDICATORIA

Al Dr. Enrique García Hernández, por su tiempo, paciencia, conocimientos, guía, palabras de aliento y brindarme todo lo que necesitaba durante el desarrollo de esta tesis. Por más tiempo y proyectos juntos.

A los miembros de mi comité tutor, Dra. Carmen Nina Pastor Colón y Dr. Marcelino Arciniega Castro, por su ojo crítico que enriquecieron enormemente mi paso por la maestría.

A los miembros del jurado, Dra. Georgina Garza Ramos, Dr. Rogelio Rodríguez Sotres, Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco, Dra. Nuria Victoria Sánchez Puig y Karina Martínez Mayorga, por sus comentarios que ayudaron a redondear este trabajo.

Al Dr. Luis Fernando Cofas Vargas, por fungir como un segundo director de tesis, tu amistad y enseñanzas son profundamente apreciadas.

A mi familia, mis padres, Rigoberto Rauda y Socorro Ceja; mis hermanos, Gaby, Ariel y Angel. Gracias por el amor a lo largo de toda mi vida, apoyo moral y económico. Todos mis logros han sido tan suyos como míos.

A mis amigos, Alberto, Ilse, Ita, David, Cristian, Karla, Alfonso, Grecia y Valeria.

Contenido

Resumen	1
Abstract.....	1
Introducción.....	2
El agua en la estructura y dinámica de proteínas	2
Efecto hidrofóbico clásico.....	4
Efecto hidrofóbico no clásico.....	5
Ciclodextrinas	7
Ciclofanos	8
Calixarenos	8
Cucurbiturilos	8
Proteínas.....	9
Lipocalinas	9
Función	11
Termodinámica de formación de complejos proteína-ligando en lipocalinas	11
Proteína de unión a odorantes 3 de rata (rOBP3)	12
Proteína de unión a odorantes bovina (bOBP)	13
Proteína mayor urinaria 1 de ratón (mMUP-1)	14
Análisis de los parámetros de unión: Firmas termodinámicas similares con firmas específicas distintas	15
Planteamiento del problema	16
Hipótesis	17
Objetivo general	17
Objetivos específicos	17
Metodología	18
Simulaciones por dinámica molecular	18
Análisis de componentes principales	19
Determinación de sitios de hidratación	19
Resultados.....	20
Flexibilidad conformacional de mMUP-1	20
Movilidad de ligandos dentro de la cavidad de mMUP-1.....	26
Hidratación interna de mMUP-1.....	30
Mecanismo de intercambio de moléculas de agua entre el seno acuoso y la cavidad de mMUP-1.....	36
Análisis de la solvatación y formación de poros entre las distintas lipocalinas	38
Conclusiones.....	40
Perspectivas.....	41
Referencias	42

Resumen

El efecto hidrofóbico no clásico es un fenómeno dirigido por la entalpía que se presenta en el reconocimiento molecular de ligandos apolares por hospederos cóncavos con cavidades parcialmente hidratadas. Para profundizar el conocimiento sobre las bases moleculares de este fenómeno, se realizó una caracterización computacional de la proteína mayor urinaria 1 de ratón (mMUP-1), miembro de la superfamilia de lipocalinas, proteínas extracelulares involucradas en el transporte de moléculas pequeñas. Se ha reportado que tanto mMUP-1 como la también lipocalina, proteína de unión a odorantes bovinas (bOBP), exhiben efecto hidrofóbico no clásico al unir ligandos apolares y la disminución de entalpía es acentuada con la inclusión de grupos metileno al analizar series de ligandos congénicos. Simulaciones de dinámica molecular de larga duración para la apoproteína mMUP-1 y en complejo con pentanol o nonanol revelaron mayores interacciones proteína-ligando y variación conformacional en la cadena principal de mMUP-1 al unir al ligando más grande. La cavidad de unión posee dos sitios de hidratación bien definidos y dos moléculas de agua deslocalizadas propensas a ser liberadas durante la formación del complejo. Sin embargo, la pérdida de moléculas de agua por parte de la cavidad al formar el complejo no se ve influenciada por el tamaño del ligando, en contraste a lo reportado para bOBP. A partir de este trabajo se explora la heterogeneidad del reconocimiento molecular de ligandos apolares, mediante dos proteínas pertenecientes a la misma familia, con firmas termodinámicas similares pero diferentes estrategias durante el reconocimiento molecular.

Abstract

Nonclassical hydrophobic effect is an enthalpy driven phenomenon that occurs in molecular recognition between hydrophobic ligands and sub-optimally hydrated concave hosts. To gain new insights into the molecular basis of this event, the *Mus musculus* major urinary protein-1 (mMUP-1) was characterized in silico and compared to the properties previously reported for bovine odorant binding protein (bOBP). Both proteins belong to the lipocalin superfamily, extracellular proteins involved in the transport of small hydrophobic molecules. It has been reported that ligand binding is driven by nonclassical hydrophobic effect in both mMUP-1 and bOBP, and the addition of methylene groups of congeneric series of ligands elicits a larger enthalpy decrease. 4- μ s long molecular dynamic simulations of apoprotein mMUP-1 and complex with pentanol and nonanol revealed that mMUP-1 exhibits more protein-ligand contacts and a greater conformational landscape upon binding of longer ligands. In the apo state, the binding cavity possess two well-defined hydration sites and two mobile water molecules that tends to be released during complex formation. Nevertheless, ligand size does not appear to influence water molecule release, contrary to the bOBP behavior. The present work explores the heterogeneity of hydrophobic ligand molecular recognition through two lipocalins that display similar binding thermodynamic signature but different strategies.

Introducción

El agua en la estructura y dinámica de proteínas

El agua juega un papel crucial en la determinación de la estructura, estabilidad, dinámica y función de las proteínas. Rige fenómenos catalíticos, de reconocimiento molecular o plegamiento. Estos dos últimos son frecuentemente producto del efecto hidrofóbico, originado por la tendencia del agua a apartarse de las regiones apolares de la proteína. La comprensión de estos fenómenos requiere la descripción de los estados energéticos y conformacionales de las moléculas de agua en contacto con la proteína (Bellisent-Funel *et al.*, 2018; Gallo *et al.*, 2018).

Las distintas propiedades que las moléculas de agua presentan con respecto a su posición con la proteína ha llevado a agruparlas en tres categorías tradicionales: 1) moléculas de agua en el seno acuoso, que se encuentran a una distancia lejana como para formar interacciones con la proteína; 2) moléculas de agua estructural, embebidas en el interior o en cavidades superficiales de la proteína, formando puentes de hidrógeno estables con los grupos polares; y 3) moléculas de agua de solvatación, que conforman las primeras capas de hidratación en la superficie de la proteína (Fischer & Verma *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2008). Adicionalmente, podemos distinguir un cuarto tipo de moléculas de agua, conocidas como moléculas de agua de alta energía, que son almacenadas en cavidades apolares de proteínas y reportadas en otras macromoléculas, cuya expulsión al seno acuoso favorece el reconocimiento molecular a través de un decremento de entalpía del sistema (Biedermann *et al.*, 2014; Tao *et al.*, 2015).

Se ha reportado de manera experimental y computacional que las interacciones con la proteína reducen la movilidad de las moléculas de agua. Mediante experimentos de resonancia magnética nuclear se ha observado que las aguas solvatantes reducen su movimiento de 2 a 10 veces con respecto a las moléculas del seno acuoso. Mientras las interacciones en el seno acuoso tienen tiempos de vida de 1 a 2 ps, las capas de solvatación mantienen sus interacciones electrostáticas de 2 a 50 ps (Halle & Davidovic, 2003; Mattea *et al.*, 2008). El número de puentes de hidrógeno se conserva al reorientar la molécula de agua para permitir las interacciones con los grupos polares de la proteína (Camilloni *et al.*, 2016). Las moléculas de agua estructurales presentan contactos que estabilizan la cadena polipeptídica de la proteína con tiempos superiores a 1 ns. Esto permite que estén bien caracterizadas y puedan ser resueltas en las estructuras cristalográficas (Nakasako, 2004).

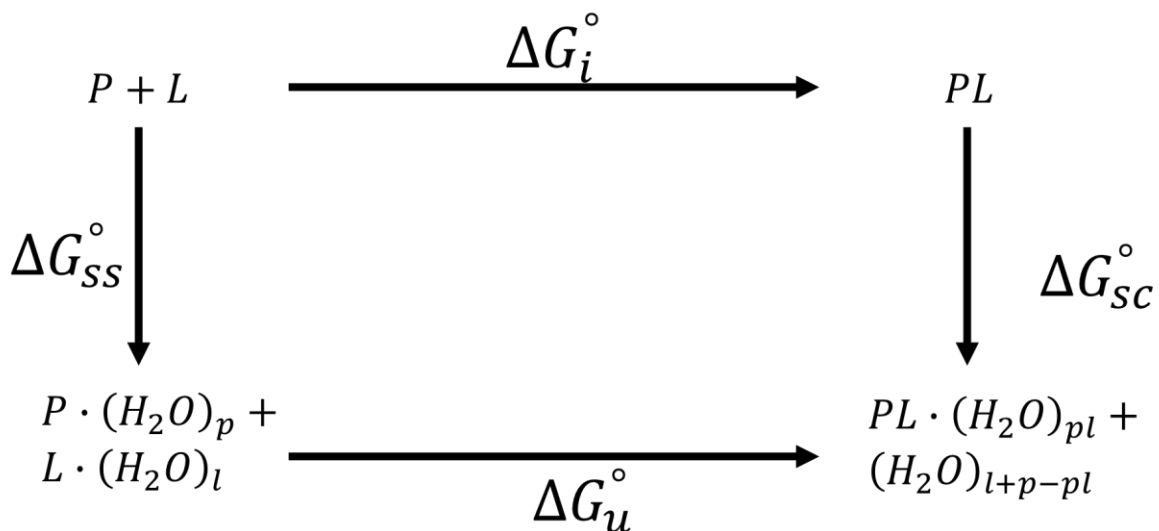
Las moléculas de agua de alta energía constituyen un caso especial de moléculas de agua confinadas por macromoléculas como las ciclodextrinas, curcubiturilos o proteínas con cavidades hidrofóbicas que inducen la formación de interfaces semejantes a las del líquido-vapor (Patel *et al.*, 2010; Sharma & Debenedetti, 2011). La baja densidad de agua en estas regiones conlleva la pérdida de puentes de hidrógeno por parte de estas moléculas de agua, energía potencial menos favorable y mayor movilidad dentro de la cavidad, producto de interacciones coulómbicas más débiles que las establecidas en el seno acuoso (Biedermann *et al.*, 2012). La liberación de moléculas de agua de alta energía contribuye favorablemente en la formación de complejos moleculares. Tanto la escasa cantidad de moléculas de agua que se llega a alojar dentro de la cavidad, que se traduce en un bajo costo entálpico de

desolvatación de la cavidad, como la tendencia a formar nuevas interacciones en el seno acuoso, parecen formar parte de la estrategia termodinámica de las macromoléculas mencionadas anteriormente.

Efecto hidrofóbico

El efecto hidrofóbico es la tendencia de moléculas no polares a agregarse en un medio acuoso, usualmente es referido como el impulsor de muchos eventos de gran importancia bioquímica como el plegamiento de proteínas que aíslan un núcleo de cadenas laterales hidrofóbicas y exponen a la superficie residuos hidrofílicos, el ensamblado de bicapas lipídicas y micelas, el acomodo de proteínas membranales entre los lípidos de la bicapa y la asociación de regiones apolares de un ligando en cavidades de unión de proteínas (Biela *et al.*, 2013). A nivel molecular, este fenómeno es atribuido a los rearrreglos del agua en las capas de solvatación de moléculas hidrofóbicas que origina la asociación de las superficies apolares (Tanford, 1980). En el plegamiento de proteínas, este fenómeno se presenta en la configuración que adoptan las cadenas laterales de los residuos no polares al formar grupos para entrar en contacto unas con otras, excluyendo las moléculas de agua. Las interacciones hidrofóbicas referidas por Walter Kauzmann (1959), son probablemente uno de los factores más importantes para la estabilización de la configuración nativa de las proteínas.

Al considerar un sistema proteína-ligando en un disolvente acuoso, los efectos de solvatación y desolvatación de los solutos deben ser tomados en cuenta para establecer la importancia del efecto hidrofóbico en el reconocimiento molecular del ligando por parte de la proteína. Esto puede ser descrito en un diagrama de ciclo de Born-Haber como el siguiente:



ΔG_u° representa el cambio en la energía de Gibbs observada experimentalmente en la formación del complejo, ΔG_i° describe las interacciones intrínsecas proteína-ligando en la ausencia de solvente y los términos ΔG_{ss}° y ΔG_{sc}° la solvatación de los solutos libres y del complejo proteína-ligando, respectivamente. Los componentes relativos a la solvatación se denotan como $(H_2O)_p$, para la proteína; $(H_2O)_l$, para el ligando y $(H_2O)_{pl}$, para el complejo. Al ser la energía de Gibbs una función de estado, podemos definir ΔG_u° en función de los componentes presentes en el ciclo.

$$\Delta G_u^\circ = \Delta G_i^\circ + \{\Delta G_{sc}^\circ - \Delta G_{ss}^\circ\}$$

Ecuaciones análogas pueden ser escritas para la entalpía y entropía de unión. A partir de esta ecuación se puede observar que además de las interacciones que se producen entre la proteína y el ligando, la relación con las moléculas de agua en el entorno juega un papel considerable en la termodinámica de unión (Homans, 2007).

Inicialmente, se consideró al efecto hidrofóbico como un fenómeno único con características estructurales, mecanísticas y termodinámicas comunes, independientemente del sistema analizado. No obstante, el estudio de diferentes sistemas hidrofóbicos modelo puso en consideración la idea que en distintos contextos moleculares el mecanismo puede diferir significativamente, siendo un ejemplo la geometría de las superficies hidrofóbicas (Snyder *et al.*, 2013).

El entendimiento de los mecanismos moleculares de los distintos efectos hidrofóbicos tiene una importancia central para entender los fenómenos de reconocimiento molecular asociado a interacciones no covalentes. Para el efecto hidrofóbico, dos tipos de firmas termodinámicas se distinguen en los procesos de unión de ligandos apolares: donde la relación del ligando y la cavidad de unión con las moléculas de solvente son determinantes para que la formación del complejo se dirija por el incremento de la entropía del sistema, conocido como efecto hidrofóbico clásico, o por la disminución de la entalpía de unión, caso del efecto hidrofóbico no clásico. A pesar de ser difícil generar evidencia experimental para entender los fenómenos de reestructuración del agua, éstos se han tratado de racionalizar a partir de modelos de interacción de agua con solutos apolares. Aunque ningún modelo es consistente con todas las características estructurales y termodinámicas de las interacciones hidrofóbicas, han sido de gran ayuda para analizar los resultados experimentales y de simulaciones en fenómenos de solvatación (Southall *et al.*, 2002).

Efecto hidrofóbico clásico

En 1945, H.S. Frank y M.W. Evans propusieron el modelo del *Iceberg*, el cual se basa en un comportamiento anómalo del agua alrededor de moléculas apolares. La entropía del agua solvatando moléculas hidrofóbicas es desfavorable, lo que interpretaron como que el agua estaba más ordenada en presencia de moléculas hidrofóbicas que en interacciones entre moléculas de agua en el seno acuoso. Esto era consistente con el incremento observado en la capacidad calorífica. Kauzmann (1959), tomando este razonamiento, sugirió que la entropía desfavorable de solvatación era la contribución que originaba que los grupos apolares de los residuos de aminoácido en las proteínas se agruparan para evitar el contacto con el agua. En la década de 1960, se lograron obtener cristales de moléculas orgánicas pequeñas hidratadas; las moléculas de agua se ordenaban alrededor de las moléculas orgánicas, y conservando 4 puentes de hidrógeno por molécula de agua, asemejando a la estructura del hielo, dando fuerza al modelo del *Iceberg* postulado 25 años atrás (Jeffrey, 1969). A pesar de lo evocativo que resulta el nombre del modelo y del arreglo del agua en los cristales, en experimentos de caracterización del agua en las primeras capas de solvatación, realizados por dispersión de neutrones no se encontró evidencia para fundamentar que estas estructuras eran realmente parecidas al hielo (Buchanan *et al.*, 2005). Mediante dinámicas moleculares, se encontró que las moléculas de agua vecinas a la molécula no polar mostraban dinámicas orientacionales y traslacionales más bajas (Galamba, 2013). No obstante, estudios complementarios de espectroscopía infrarroja de dos dimensiones y simulaciones de dinámica molecular concluyeron que el orden en la capa de solvatación

no corresponde a estructuras que asemejen al hielo. Sin embargo, confirma que la movilidad traslacional y rotacional se disminuye drásticamente y con ello la reorientación; en ese caso, se afecta la dinámica de intercambio de puentes de hidrógeno, mucho más lenta en las inmediaciones del soluto (Bakulin *et al.*, 2009).

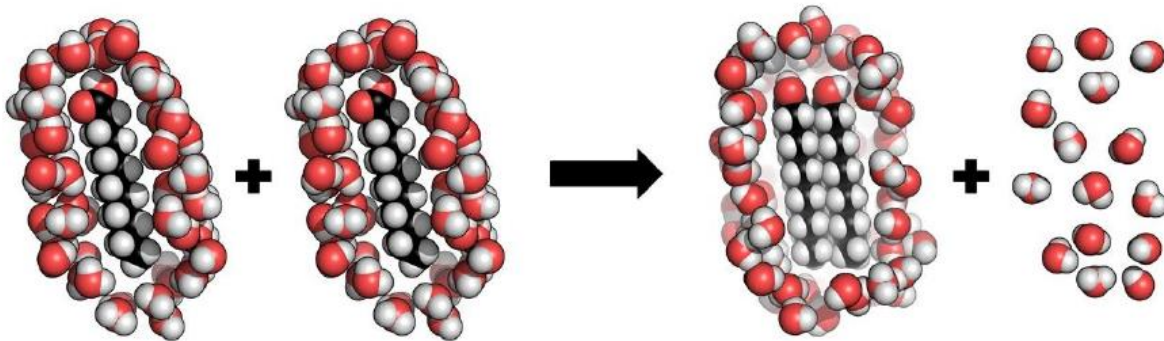


Figura 1: La liberación de moléculas de agua solvatantes durante la asociación de moléculas hidrofóbicas propicia el aporte entrópico característico del efecto hidrofóbico clásico.

El mecanismo clásico del efecto hidrofóbico predice un decremento en la entropía de las moléculas de agua solvatando solutos no polares. Las moléculas de agua forman estructuras con orientaciones más restrictivas alrededor del soluto para maximizar sus interacciones electrostáticas. Como se propone en el modelo del *iceberg* de Frank y Evans (1945), las moléculas de agua tienden a mantener el máximo número de puentes de hidrógeno, formando arreglos en forma de jaula alrededor de los solutos hidrofóbicos, similares a la estructura de los clatratos, con un costo entrópico significativo (Southall *et al.*, 2002). Una vez que el ligando se une a la proteína, la capa de agua que rodea la cavidad y el ligando apolar es liberada, como se muestra en la figura 1. La pérdida de moléculas de agua ordenadas provoca el incremento en la entropía del sistema y disminución en la capacidad calorífica (Homans, 2007). Sin embargo, la firma termodinámica de este fenómeno es dependiente de la temperatura, y en temperaturas cercanas al punto de ebullición, las preferencias de orientación del solvente son más débiles con el incremento en la temperatura, el componente entrópico es menos importante y es el incremento en la entalpía lo que limita la transferencia del soluto no polar (Silverstein *et al.*, 1998).

Efecto hidrofóbico no clásico

El descubrimiento de fenómenos de reconocimiento de ligandos hidrofóbicos caracterizados por la disminución en la entalpía de unión como principal contribuyente, derivó en que se reformulara el efecto hidrofóbico. A pesar de que la formación de nuevas interacciones específicas entre los solutos es un contribuyente favorable a la entalpía global de unión, la naturaleza y magnitud es similar tanto en fenómenos dirigidos entrópicamente como entálpicamente. Este mecanismo alternativo nace del comportamiento del agua en las regiones hidrofóbicas que conforman la cavidad de la proteína donde se asienta el ligando, se le denomina efecto hidrofóbico no clásico, en contraposición al efecto hidrofóbico clásico (Snyder *et al.*, 2011).

A medida que se han descubierto e incrementado el interés de las uniones proteína-ligando entre moléculas apolares y que son dirigidos entálpicamente, modelos alternativos han sido postulados para explicar la naturaleza de este fenómeno. Estudios en distintas moléculas como ciclodextrinas, asociación de lectinas y carbohidratos y proteínas de unión a DNA, fenómenos entálpicamente dirigidos, intuyeron que la liberación de moléculas de agua asociadas débilmente a las cavidades de unión podría presentar diferencias estructurales que derivaran en una diferencia entre la energía libre de las moléculas retenidas y el seno acuoso. Este efecto está principalmente favorecido por la hidratación anómala y subóptima de las cavidades de unión no polares de las proteínas libres. Según lo reportado por simulaciones de dinámicas moleculares, las moléculas de agua contenidas en los bolsillos hidrofóbicos presentan propiedades características de las moléculas de agua de alta energía, cuya liberación se asocia con un bajo costo de desolvatación de la proteína y alta energía de interacción con las moléculas de agua del seno acuoso (Biedermann *et al.*, 2014; Gómez-Velasco *et al.*, 2020). Incluso se ha hipotetizado que estas cavidades están completamente deshidratadas previo a la unión con el ligando (Homans, 2007).

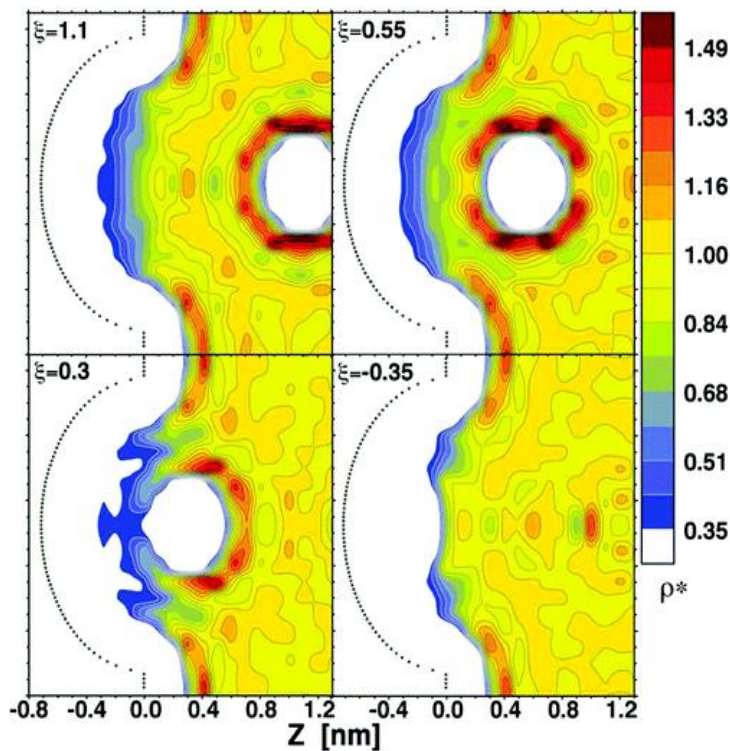


Figura 2: Mapas de distribución de densidad de agua durante la simulación de una cavidad hemisférica apolar de 0.8 nm de radio y un ligando esférico que emula las propiedades del metano, usando el modelo TIP4P para las moléculas de agua. El parámetro ξ es la distancia entre el centro del ligando esférico y la pared hidrofóbica. El código de colores está normalizado para que $\rho^*=1$ corresponda a 998 g/L, la densidad promedio del agua en el seno acuoso durante la simulación (Tomado de Setny *et al.*, 2010).

Este fenómeno se ha detectado en una variedad creciente de proteínas y otras entidades químicas (Seelig & Ganz, 1991; Rekharsky *et al.*, 2007; Lockett *et al.*, 2013). Distintos estudios de reconocimiento molecular han contribuido a delinear características que propician la liberación de moléculas de agua de alta energía. La geometría cóncava ayuda a limitar la interacción de las moléculas de solvente con

el seno del disolvente, tal es el caso de los hospederos cíclicos como los barriles moleculares, los cuales previenen el contacto entre estos dos estados del disolvente; en cambio, estructuras planas o aquellas donde la entrada de la cavidad es muy amplia, disminuye la contribución del efecto hidrofóbico no clásico en la unión (Snyder *et al.*, 2011).

La influencia de la concavidad en los sitios de unión se evaluó mediante modelado molecular y simulaciones de dinámica molecular caracterizando los cambios en las propiedades de solvatación y la firma termodinámica de unión entre una superficie hemiesférica y un ligando esférico, ambos de naturaleza hidrofóbica (Figura 2). La capa de solvatación de la superficie cóncava posee una baja densidad de moléculas de agua, propias de un estado más parecido a vapor, que presentan mayor entropía y entalpía desfavorable en comparación con las moléculas en el disolvente. Los mapas de densidad de agua muestran la deshidratación gradual del sitio de unión a medida que el ligando se acopla y la liberación de moléculas de agua produce un gran cambio favorable en la entalpía que domina sobre el costo entrópico derivado de perder la región de alta movilidad en el interior de la cavidad (Setny *et al.*, 2010).

La Figura 3 muestra distintos hospederos con geometría cóncava cuya firma termodinámica es propia del efecto hidrofóbico no clásico:

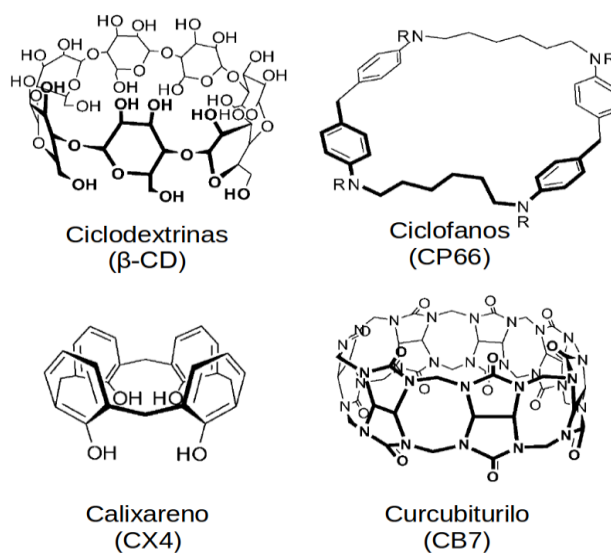


Figura 3: Distintas moléculas hospederas que presentan efecto hidrofóbico no clásico durante la unión con su ligando.

Ciclodextrinas

Las ciclodextrinas forman cavidades hidrofóbicas que unen moléculas orgánicas y su exterior hidrofílico permite su solubilización, lo que las han hecho moléculas populares como hospederos para investigación y aplicaciones de reconocimiento molecular. La termodinámica de unión a ligando presenta una contribución principal por parte de la entalpía. Las ciclodextrinas interactúan con una amplia cantidad de ligandos, entre los que destacan alcoholes alifáticos, dioles, aminas y derivados de ciclohexano, en los cuales se presentan la tendencia de disminuir la entalpía con la inclusión de un mayor número de grupos metilenos (Rekharsky *et al.*, 1998). Así mismo, comparando las firmas

termodinámicas entre α -CD (6 unidades de glucosa) y β -CD (7 unidades de glucosa), el componente entrópico en las β -CD es favorable y de mayor magnitud que el de las α -CD. La ganancia de entropía originada por la incapacidad de unir el ligando en una posición particular tiene una compensación entálpica, al disminuir la magnitud de las interacciones (Chen *et al.*, 2004; Castronuovo & Niccoli, 2011). Según simulaciones de dinámica molecular, las cavidades no se encuentran completamente deshidratadas, con un promedio de 3.6 moléculas de agua en la α -CD y 4.4 en la β -CD. Estas moléculas presentan frustración energética al enlazarse con menos puentes de hidrógeno que las moléculas de agua en el seno acuoso, por lo que, energéticamente y en conjunto, la retención representa la pérdida de 3.1 puentes de hidrógeno, que contribuyen en la entalpía de unión al desalojar la cavidad (Bierdermann *et al.*, 2014).

Ciclofanos

Los ciclofanos son moléculas orgánicas conformadas por unidades de anillos aromáticos no adyacentes conectados mediante cadenas alifáticas, esto confiere un centro hidrofóbico a la molécula. Trabajos publicados sobre el reconocimiento molecular de ligandos aromáticos con ciclofanos en diferentes solventes, mostraron la dependencia que tiene el evento a la presencia de agua como solvente en el cambio de energía libre, es decir la importancia del efecto hidrofóbico en la termodinámica de una unión entálpicamente dirigida (Smithrud & Diederich, 1990; Smithrud *et al.*, 1991). Además, repararon en la influencia de la forma del hospedero al resaltar que ciclofanos con conformaciones abiertas y planas son menos efectivos para impedir que el agua solvatante forme puentes de hidrógeno que hospederos similares con conformaciones cóncavas. Así, cuando el ligando desplace las moléculas de agua secuestradas en la cavidad del ciclofano, la regeneración de las fuerzas cohesivas en el agua y las interacciones de van der Waals soluto-soluto contribuirán favorablemente en la entalpía de reacción (Meyer *et al.*, 2003).

Calixarenos

Los calixarenos son moléculas cíclicas y aromáticas cuya estructura cónica asemeja a una copa. De entre los calixarenos solubles en agua, la flexibilidad del p-sulfonatocalix[4]areno (CX4) le permite la unión de ligandos de tamaño similar a la β -CD, pero con mayor afinidad a unir ligandos con grupos ionizados (Bakirci *et al.*, 2005). Se ha observado la habilidad de unir una molécula de agua dentro de su cavidad cóncava mediante dos puentes de hidrógeno con la nube de electrones π de los anillos aromáticos, estimando su contribución energética, a partir de un cristal, en unos 7.5 kJ/mol (1.8 kcal/mol) por cada enlace (Fucke *et al.*, 2011). Las interacciones π también se forman con moléculas alifáticas de forma C-H \cdots π preferentemente a interacciones de apilamiento (Weimann & Schalley, 2008), incluso, la adición de grupos fenilo en el ligando reducen la afinidad con CX4 (Bakirci *et al.*, 2005; Bierdermann *et al.*, 2014).

Cucurbiturilos

Los sistemas de cucurbiturilos (CB_n) son macrociclos artificiales, conformados de unidades de glicouril unidos por puentes metílenos, que presentan una cavidad altamente hidrofóbica. Presentan afinidades extremadamente grandes para moléculas neutras, donde el hospedero CB7 es de los más destacados

en este ámbito con constantes de afinidad por encima de 10^{10}M^{-1} y procesos altamente exotérmicos, hasta de -90 kJ / mol (21.5 kcal/mol) (Rekharsky *et al.*, 2007). Mediante simulaciones de dinámica molecular se ha confirmado la liberación de moléculas de agua desde el interior de los barriles que forman los CB_n cuando el ligando es captado (Nguyen *et al.*, 2012). La liberación de estas moléculas de agua supone el aporte principal para la entalpía de unión, al estar energéticamente frustradas en la cavidad formando menos puentes de hidrógeno que en el seno acuoso. Este efecto se incrementa con la reducción del tamaño del macrociclo hasta CB7 (214 \AA^3); cavidades menores, como CB5 (45 \AA^3) y CB6 (118 \AA^3), resguardan moléculas energéticamente más frustradas, pero en menor cantidad, por lo que la influencia del efecto hidrofóbico no clásico disminuye en la termodinámica de unión (Biedermann *et al.*, 2012). Como la termodinámica de unión es dependiente de la habilidad del ligando para desplazar las moléculas de agua residentes de la cavidad hidrofóbica, ligandos más pequeños presentan constantes de afinidad más bajas que aquellos más voluminosos (Ko *et al.*, 2011), lo cual es observado también en algunos sistemas de proteínas (Snyder *et al.*, 2011; Gómez-Velasco *et al.*, 2020).

Proteínas

Mediante técnicas calorimétricas, análisis estructurales y métodos computacionales ha sido posible diferenciar la liberación de moléculas de agua propia del efecto hidrofóbico no clásico en sistemas de reconocimiento molecular (Carey *et al.*, 2000; Englert *et al.*, 2010; Barelier *et al.*, 2013). El complejo formado por la anhidrasa carbónica con diferentes sulfonamidas aromáticas como ligando es uno de los modelos mejor estudiados de reconocimiento molecular dirigido entálpicamente en proteínas. A partir del cual se ha observado la expulsión de moléculas de agua del sitio de unión de la enzima para superar las barreras de la compensación entalpía-entropía, observando que el incremento en la afinidad está correlacionado con la liberación de moléculas de agua y no del área superficial asociado al ligando, como se hipotetizó en primera instancia (Snyder *et al.*, 2011; Lockett *et al.*, 2013). En el caso de la proteína con forma de herradura Cox-2, ésta posee un bolsillo hidrofóbico que, de acuerdo con simulaciones, se encuentra deshidratado la mayor parte del tiempo y sin configuraciones estables del solvente, evitando el costo de desolvatación del sitio activo (Young *et al.*, 2010). Las moléculas de agua en los bolsillos de unión proteicos presentan frustración energética por la pérdida de puentes de hidrógeno, como en los receptores artificiales anteriores, lo que requiere que las cadenas laterales de los residuos no polares estén orientadas hacia el interior del bolsillo (Biela *et al.*, 2013).

Lipocalinas

Las lipocalinas son una superfamilia de proteínas amplia y heterogénea que se presenta en animales, plantas, hongos y bacterias. Constituyen un grupo de proteínas pequeñas, generalmente extracelulares, con menos de 200 residuos de aminoácidos y peso molecular está alrededor de los 20 kDa, cuya función está basada en la unión a moléculas hidrofóbicas (Flower *et al.*, 2000). Pese a la baja identidad entre diferentes homólogos, que puede estar por debajo del 10%, dentro de la familia se conserva una estructura tridimensional que le da sus características más determinantes. Se conforma de 3 motivos estructurales, un barril β de 8 hebras antiparalelas (marcadas como A-H o también 1-8), donde se sitúa la cavidad de unión y le da la forma de cáliz, flanqueado por una hélice 3_{10} en el extremo N-terminal y una hélice α en el extremo C-terminal, que se empaca paralelamente a las hebras del barril (Figura 4). Las hebras del barril se conectan por 7 bucles siendo propios de horquillas beta, con excepción del

primero, el cual es un bucle Ω más largo. El sitio de unión generalmente posee un extremo cerrado y otro abierto, también conocido como boca del barril. Sin embargo, algunas proteínas presentan su cavidad completamente cerrada y la interacción con el exterior se da por poros transitorios que se generan en el barril (Lakshmi *et al.*, 2015).

Se han identificado 3 regiones estructuralmente conservadas (SRC), como se muestra en la figura 4, correspondientes a secuencias de motivos característicos que han sido utilizadas como criterio para definir dos subfamilias: las lipocalinas núcleo, que presentan las tres SRC, y las atípicas con una o dos SRC (Flower *et al.*, 2000). La región SRC1 involucra a la hélice 3_{10} y la hebra A con motivo conservado caracterizado por la secuencia G-x₁-W-x₂ en la primera hebra, el residuo x₂ generalmente es aromático (Y, W, F); la región SRC2, se distingue por la secuencia T-D-N/Y-x-x-Y, conforma parcialmente las hebras F y G, así como el bucle L₆ que las conecta; finalmente la región SRC3 cubre parte de la hebra H y el asa que la conecta con la hélice α en el extremo C-terminal, contiene un único residuo cargado al final de la hebra H, el cual puede ser R o K (Flower, 1996).

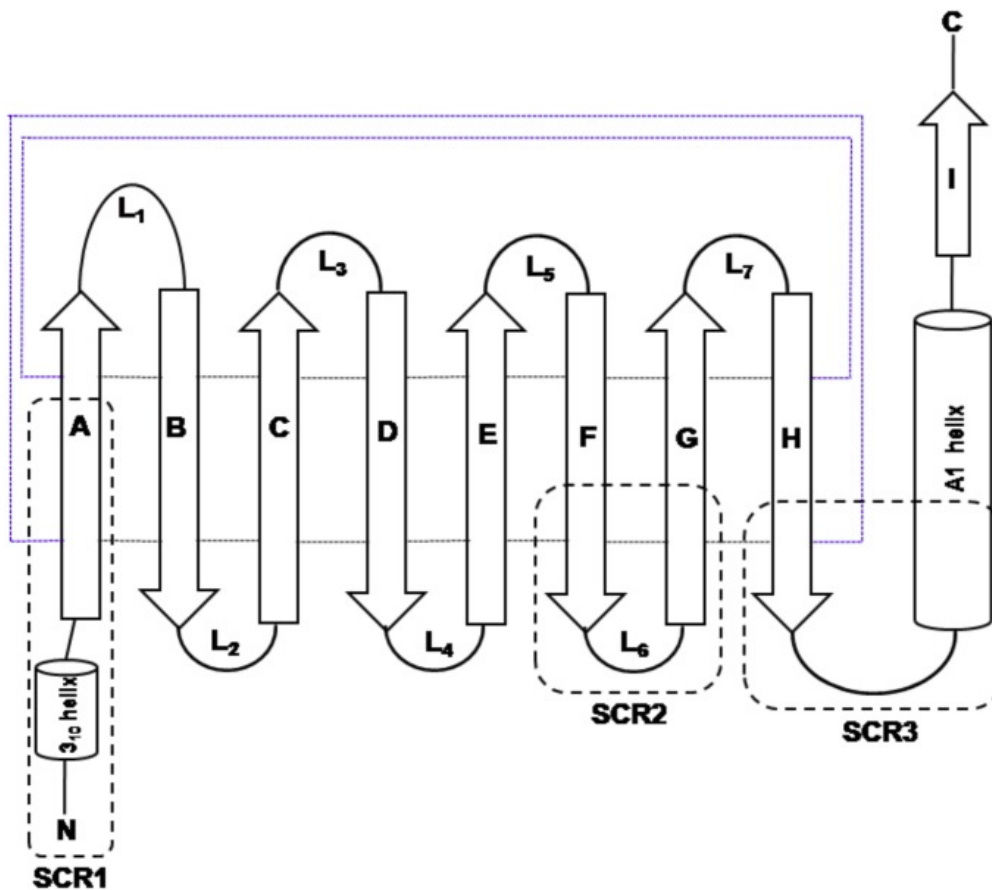


Figura 4: Diagrama de plegamiento de lipocalinas. Las hebras β y hélices son representadas con flechas y cilindros, respectivamente. Las asas que conectan a las hebras del barril son nombradas secuencialmente L1 a L7. Las 3 regiones estructuralmente conservadas (SRC) son señaladas como SCR1 a SCR3 (Lakshmi *et al.*, 2015).

Función

Las lipocalinas son mejor conocidas por la habilidad de unir ligandos pequeños hidrofóbicos en la cavidad conformada por el barril β de manera promiscua. El fondo del barril es cerrado por la hélice 3₁₀. El tamaño de la cavidad interior, así como la composición de aminoácidos, determinarán la selectividad de esa proteína para sus ligandos. La evidencia experimental también reporta la interacción de lipocalinas con receptores de superficie celular que pueden involucrar eventos de endocitosis (Flower, 1995).

Las lipocalinas fueron clasificadas originalmente como proteínas de transporte, ejemplos de esto son el transporte de vitamina A realizado por la proteína de unión a retinol, la cual es un modelo ampliamente estudiado dentro de las lipocalinas (Newcomer & Ong, 2000); las proteínas de unión a odorantes (OBP) que unen ligandos apolares en un rango estructuralmente amplio como terpenoides, pirazinas y compuestos aromáticos, que permiten el paso de estas moléculas a través de las mucosas acuosas, como un mecanismo de entrega a los receptores olfatorios, remoción o filtro de sustancias no polares (Pevsner & Snyder, 1990); de manera análoga, la familia de la proteína mayor unitaria (MUP) encontrada en mamíferos como ratones, existe mayor diversidad con 21 isoformas. Son proteínas secretadas en la orina que unen principalmente feromonas en un complejo que permanece estable en condiciones ambientales y propicia la comunicación intraespecie (Mucignat-Caretta & Caretta, 2014).

Algunas lipocalinas tienen acción sobre receptores de superficie celular como la lipocalina lagrimal, α -microglobulina, o las propias OBP y MUP, las cuales incluso pueden asociarse al mismo receptor. La unión de las lipocalinas desata eventos de endocitosis para entregar el ligando capturado (Dartt, 2011). Asociaciones menos comunes con otras proteínas no receptoras se dan por ejemplo en la unión de transtirretina con la proteína de unión a retinol, para el transporte de retinol a tejidos específicos (Newcomer & Ong, 2000) o la inactivación de la gelatinasa B por unión a la lipocalina neutrófilo gelatinasa (Yan *et al.*, 2001).

Antecedentes

Termodinámica de formación de complejos proteína-ligando en lipocalinas

La comprensión del mecanismo y la afinidad asociada al reconocimiento molecular sigue siendo un área de investigación de interés para la biofísica moderna. La heterogeneidad de la familia de las lipocalinas agrupa a proteínas con baja identidad de secuencia y estructura tridimensional bien conservada, capaces de cumplir funciones similares al unir ligandos de naturaleza hidrofóbica a través de estrategias energéticas que pueden generar firmas termodinámicas completamente distintas entre una proteína y otra, por lo que representan modelos interesantes para establecer las bases del efecto hidrofóbico. Miembros de esta superfamilia presentan firmas termodinámicas dirigidas por la entalpía, entropía o con contribuciones similares dependientes del ligando, por lo que la heterogeneidad presente se traduce en diversas estrategias energéticas utilizadas para la unión de ligandos hidrofóbicos. Por ejemplo, los complejos proteína-ligando de las isoformas A y B de la β -lactoglobulina bovina son estabilizados pueden presentar cambios favorables en la entropía y entalpía de unión (Loch *et al.*, 2013 & Rovoli *et al.*, 2018). De acuerdo con el ligando y la isoforma se presentan interacciones de efecto

hidrofóbico clásico, no clásico o con contribuciones entálpicas y entrópicas similares. En cambio, el efecto hidrofóbico no clásico aparece de manera invariable en isoformas de la proteína urinaria mayor de ratón (mMUP) (Barrat *et al.*, 2005; Malham *et al.*, 2005; Ricatti *et al.*, 2018), la proteína de unión a odorantes bovina (bOBP) (Gómez-Velasco *et al.*, 2020) y la isoforma 3 en rata (rOBP3) (Portman *et al.*, 2014). De acuerdo con las estructuras cristalográficas de estas proteínas, la cavidad de unión se encuentra aislada del solvente en la región de la boca, llevándose a cabo el intercambio de solventes y soluto mediante poros transitorios formados en el barril. Únicamente para bOBP se ha generado un análisis de la evidencia experimental contrastado con caracterizaciones computacionales que concluyen que existen patrones de hidratación atípicos dentro de la cavidad y son parte crucial del mecanismo de unión (Gómez-Velasco *et al.*, 2020). Observaciones que han sido hipotetizadas tanto para mMUP-1 (Homans, 2007) y rOBP3 (Portman *et al.*, 2014), a pesar de que la hidratación interna de estas proteínas aún no ha sido caracterizada.

Proteína de unión a odorantes 3 de rata (rOBP3)

La rOBP3 fue descrita primero como una proteína salivaria específica, α -2u globulina, de rata (*Rattus norvegicus*) (Gao *et al.*, 1989). Aislada posteriormente del epitelio olfatorio y por su capacidad de unir a moléculas odorantes, con preponderancia por moléculas con anillos, como compuestos aromáticos o heterociclos, fue rebautizada como rOBP3 (Lobel *et al.*, 2001). Sorprendentemente, esta proteína ha sido comúnmente referida como una MUP por su presencia en la fracción proteica urinaria de ratas y por su baja identidad de secuencia con la OBP1 (28%) y la OBP2 (18%) y alta identidad de secuencia con MUP ($\approx 80\%$), por lo que es posible que, a diferencia del caso del ratón, en este organismo MUP no sea tejido específico y pueda cumplir roles olfatorios de la misma manera (Gómez-Baena *et al.*, 2019).

El análisis termodinámico más exhaustivo disponible de rOBP3 unida a ligandos hidrofóbicos, fue reportado por Portman *et al.*, (2014). Mediante análisis estructurales obtenidos por cristalografía de rayos X, mediciones calorimétricas y resonancia magnética nuclear de la proteína silvestre y dobles mutantes en la cavidad de unión demostraron que la energía de unión está modulada por dos procesos de solvatación con firmas termodinámicas distintas. La cavidad de rOBP3 está excluida del solvente mediante la Y103 que bloquea la boca del barril, y posee unos pocos residuos polares, destacando E137, un residuo conservado cuyo homólogo en MUP IV está involucrado en la formación de puentes de hidrógeno con grupos funcionales del ligando. El análisis de la termodinámica de unión de rOBP3 ante una serie de γ -lactonas, con un sustituyente alifático de 2 a 6 metilenos, sugiere la modulación de dos procesos distintos de desolvatación. La desolvatación del ligando sigue un modelo de interacción hidrofóbica clásica por la liberación de moléculas de agua altamente ordenadas ($\Delta S > 0$, $\Delta H > 0$), mientras que la deshidratación de la cavidad de unión libera agua de “alta energía”, en un modelo de efecto hidrofóbico no clásico ($\Delta S < 0$, $\Delta H < 0$). Presenta una firma termodinámica de unión entálpicamente dirigida, con una fuerte compensación entálpica/entrópica, por lo que el cambio en la energía libre no se modifica en relación con el incremento de los grupos hidrofóbicos ($\Delta G^\circ \approx -7.4$ kcal/mol). Sin embargo, en términos de la compensación, el incremento de metilenos volvía la entalpía de unión menos favorable ($\Delta \Delta H^\circ > 0$) y la entropía más favorable ($T \Delta \Delta S^\circ > 0$), efecto totalmente opuesto a lo observado por el grupo de Homans en MUP. Mediante NMR se observa que los residuos de aminoácidos perturbados por desplazamiento químico interactúan de manera distinta con diferentes tamaños de cadenas alifáticas. Finalmente, se probaron dobles mutantes de residuos formando la cavidad, reemplazando F \rightarrow A para evaluar la influencia de la arquitectura del sitio de unión en la estructuración

del solvente y la energética de unión por la expansión de la cavidad. Se diseñaron dos proteínas dobles mutantes F73A:F75A y F109A:F122A, con efectos modestos en el cambio de energía libre ($\Delta\Delta G^\circ > -1.4$ kcal/mol), pero considerablemente más exotérmica, llegando hasta $\Delta H^\circ = -27.5$ kcal/mol. Planteando la posibilidad de que la capacidad de acomodar más moléculas de agua en una cavidad más amplia permite la liberación extra de agua de alta energía que favorece la contribución entrópica de la unión.

Proteína de unión a odorantes bovina (bOBP)

Encontrada en abundancia en la mucosa nasal. Además del papel que cumplen en el acarreo de moléculas no polares hacia los receptores olfatorios a través de la mucosa, une al compuesto volátil 1-octen-3-ol, alcohol insaturado atrayente de insectos, presumiblemente para limitar su disponibilidad en el ambiente con el fin de disminuir las picaduras de insecto (Ramoni *et al.*, 2001). La estructura de bOBP muestra su cavidad aislada del solvente, por lo que el intercambio de materia con el exterior se da por rotaciones transitorias de cadenas laterales de aminoácidos. Las estructuras cristalográficas permitieron suponer que la vía más probable involucra a los residuos F36 y Y83 (Bianchet *et al.*, 1996). En cambio, en simulaciones de dinámica molecular, no se observa rotación del residuo Y83, pero sí la aparición de tres poros transitorios correspondientes a los residuos F36, V69 y el tercero coordinado por los residuos Y79-F89-I91. Los 3 poros permiten el paso del ligando al interior (Gómez-Velasco *et al.*, 2020). Contrasta con otras lipocalinas por su estructura homodimérica, pues es la única que presenta intercambio de dominio, los últimos 38 aminoácidos, que conforman dos hélices α , una hebra β y un giro, del extremo C-terminal se posan sobre el barril β de otro monómero, completando la estructura usual de las lipocalinas (Bianchet *et al.*, 1996). La inserción de un residuo de glicina en la posición 121 puede prevenir el intercambio de dominios generando un monómero funcional, pero con el extremo C-terminal extendido, no flanqueando a la estructura de barril como en la estructura típica de lipocalinas (Ramoni *et al.*, 2002).

La termodinámica de unión del dímero con la estructura nativa (bOBP) y la del monómero mutante, con el residuo de glicina insertada en la posición 121 (bOBP_{121G+}), tienen una firma dirigida entálpicamente con disminución en la entropía muy similar. La afinidad es mayor para el 1-octen-3-ol comparándola con el 1-hexen-3-ol ($\Delta\Delta G^\circ \approx +2$ kcal/mol, $\Delta\Delta H^\circ \approx +5$ kcal/mol, $T\Delta\Delta S^\circ \approx +3.2$ kcal/mol). Simulaciones de DM indicaron que la solvatación de la cavidad de unión es más rápida en el monómero bOBP_{121G+} que, en el dímero, con una presencia de 7.6 ± 2.9 moléculas de agua promedio en la apo cavidad y la pérdida de ~ 5 y ~ 7 moléculas de agua para el hexenol y el octenol, respectivamente. La cavidad está hidratada de manera subóptima en ausencia del ligando, indicado por la baja densidad del agua secuestrada, que la posiciona con propiedades energéticas intermedias entre el agua líquida y el vapor, las cuales muestran una movilidad significativa (RMSF de 3.5 ± 0.1 Å): Las moléculas de agua están energéticamente frustradas, al formar menos puentes de hidrógeno que el agua bulto y tienen mayor energía potencial, por lo que es de esperar que su liberación al seno acuoso represente un aporte favorable a la entalpía de enlace. La liberación diferencial de moléculas de agua entre el hexenol y octenol puede contribuir a las propiedades termodinámicas de unión (Gómez-Velasco *et al.*, 2020).

Proteína mayor urinaria 1 de ratón (mMUP-1)

Dentro de la familia de las lipocalinas, la MUP-1 de *Mus musculus*, ha servido como un modelo importante para la descripción de fenómenos asociados a la formación de complejos hidrofóbicos mediante caracterizaciones experimentales y computacionales. La cavidad está formada por residuos de aminoácidos con cadenas laterales no polares, a excepción de las tirosinas en las posiciones 84 y 120. La primera se ubica en la boca de la lipocalina, por lo que representa un residuo candidato a funcionar como poro de entrada; la segunda se encuentra dentro de la cavidad de unión y suele estar asociada a una molécula de agua cristalográfica (Timm *et al.*, 2001). El volumen interno es alrededor de 491 Å³ y no es ocupado en su totalidad por el ligando, incluso en su ausencia las estructuras cristalográficas de mMUP muestran 2 o 4 molécula de agua en su interior, sin embargo, las características de la técnica no permiten definir si la cavidad está parcialmente deshidratada o si la presencia de aguas poco ordenadas no permite su visualización (Kuser *et al.*, 2001; Syme *et al.*, 2007).

La firma termodinámica de unión es característica del efecto hidrofóbico no clásico, fuertemente dirigida por la entalpía de unión, con una contribución entrópica desfavorable y cambio negativo en la capacidad calorífica (Sharro *et al.*, 2003). La unión de alcoholes alifáticos en la serie de pentan-1-ol a nonan-1-ol a 300 K incrementa la favorabilidad de la entalpía ($\Delta\Delta H^\circ < 0$) y compensa parcialmente haciendo menos favorable la entropía ($T\Delta\Delta S^\circ < 0$) cuando el ligando incrementa su superficie hidrofóbica, con un efecto favorable en el cambio de energía libre ($\Delta\Delta G^\circ < 0$). Las estructuras cristalográficas de estos complejos muestran una molécula de agua ordenada en la cavidad del bolsillo de unión que, con algunos ligandos como el pentan-1-ol, octan-1-ol y nonan-1-ol, media un puente de hidrógeno entre el grupo hidroxilo y la Y120. En cambio, el hexan-1-ol y el heptan-1-ol enlazan directamente con este residuo. Todas las estructuras presentan una única molécula de agua ordenada, a excepción del heptan-1-ol con tres. Mediante la metodología de CMIP (por sus siglas en inglés, Classical Molecular Interaction Potential), que permite predecir la posición de moléculas de agua cristalográficas, hay una tendencia de incremento o reducción de acuerdo del tamaño del ligando, por lo que el incremento de la entalpía podría ser motivada por mayores interacciones en el componente intrínseco proteína-ligando (Malham *et al.*, 2005).

En otro estudio utilizando 2-metoxi-3-isobutylpirazina (IBMP), el puente de hidrógeno entre la Y120 y el nitrógeno en el anillo también está presente. Cuando la tirosina es mutada a una fenilalanina, la entalpía de unión es menos favorable por unos 2.9 kcal/mol y de nuevo, se presenta una compensación entrópica de cerca de 1.7 kcal/mol más favorable, reflejada en el cambio de energía libre $\Delta\Delta G^\circ \approx +5$ kJ/mol (+1.2 kcal/mol), la cual aun así se mantiene negativa. Mediante simulaciones de dinámica molecular, se observó que, a pesar de ser una proteína con la cavidad cerrada, un número subóptimo de moléculas de agua desordenadas son retenidas en proteínas que no forman complejo de unión, en una solvatación subóptima, aproximadamente 3.5 moléculas de agua. En este caso, sugirieron que el descenso de entalpía derivada de la desolvatación de la proteína puede compensar la entalpía desfavorable de la desolvatación de IBMP ($\approx +12$ kcal/mol) y el componente principal surge de la dominancia de las interacciones soluto-soluto por encima de las interacciones soluto-solvente en una cavidad pobremente solvatada (Barrat *et al.*, 2005). La entropía desfavorable presentada en este sistema fue explicada a partir del cambio de entropía intrínseco ($T\Delta S^\circ$) desfavorable, esperado por la pérdida de grados de libertad al formar el complejo proteína ligando, y la incapacidad de contrarrestarlo por parte de la desolvatación de la cavidad hidrofóbica, por encontrarse pobremente solvatada ($T\Delta S^\circ_{\text{solvPL}} - T\Delta S^\circ_{\text{solvP}} \approx 0$) (Shimokhina *et al.*, 2006). Con relación a la capacidad calorífica, el componente mayoritario en su reducción lo lleva la desolvatación del ligando (< -450 J/K mol), como se observa en el efecto hidrofóbico clásico, aun así, no se debe pasar por alto que la aportación de la

desolvatación de la proteína estuvo alrededor de -25 cal/K mol , producto de la liberación de moléculas de agua ordenadas y desordenadas de la estructura apo. Este estudio aportó la estructura cristalizada de la mMUP-1 en su forma apo, la cual presenta 4 moléculas ordenadas alojadas en la cavidad de unión (Syme *et al.*, 2007).

Análisis de los parámetros de unión: Firmas termodinámicas similares con firmas específicas distintas

La evidencia experimental generada alrededor de los parámetros de unión de mMUP-1, rOBP3, y bOBP ha revelado a tres proteínas que presentan su firma termodinámica de unión correspondiente al efecto hidrofóbico no clásico, es decir, dirigida entálpicamente. No obstante, al analizar distintas series de ligandos, diferenciados por la longitud de cadenas alifáticas, la inclusión de grupos metilenos tiene impactos distintos en cada proteína. La Tabla 1, comparativa presentada por Gómez-Velasco, *et al.* (2020), sistematiza los datos para bOBP al unir hexenol y octenol, mMUP-1 en la unión de n-alcoholes de cadena alifática (Malham *et al.*, 2005; Syme *et al.*, 2007) y rOBP3 con γ -lactonas (Portman *et al.*, 2014).

Tabla 1: Comparación de las firmas termodinámicas específicas por grupo metileno para distintas lipocalinas. ΔH_{CH_2} , $T\Delta S_{CH_2}$ y ΔG_{CH_2} (kcal/mol), ΔCp_{CH_2} (cal/mol·K), T (°C) (Gómez-Velasco *et al.*, 2020).

Lipocalina	Ligandos	ΔH_{CH_2}	$T\Delta S_{CH_2}$	ΔG_{CH_2}	ΔCp_{CH_2}	T
bOBP	Hexenol, octenol	-2.5 ± 0.1	-1.6 ± 0.2	-0.9 ± 0.1	-1 ± 4	30
mMUP-1	Pentanol a nonanol	-1.4 ± 0.0	-0.4 ± 0.0	-1.0 ± 0.0	-12 ± 4	27
rOBP3	γ -pentalactona a γ -undecalactona	$+2.4 \pm 0.2$	$+2.5 \pm 0.1$	-0.1 ± 0.1	No disponible	25

De la Tabla 1, se puede distinguir que el efecto hidrofóbico no clásico se acentúa con la adición de grupos metileno en los ligandos para bOBP y mMUP-1, y hay una ganancia aproximada de 1 kcal/mol en la energía de Gibbs de unión; en el caso de bOBP, el efecto sobre la entalpía es mayor del que se observa para mMUP-1, lo que involucra una compensación igualmente mayor para la entropía, debido que al final el incremento en la afinidad no es distinto entre las dos proteínas; además, el cambio en la capacidad calorífica está más marcado en mMUP-1, con una magnitud cercana a la que se esperaría para la desolvatación del grupo metileno, mientras que la contribución para bOBP es marginal. En cambio, rOBP3 exhibe el efecto opuesto, su firma termodinámica *específica* (es decir, normalizada por grupo metileno) corresponde con el efecto hidrofóbico clásico (entropía favorable y entalpía desfavorable), en un proceso prácticamente isoergónico. A pesar de ser tres proteínas con estructuras y firmas termodinámicas similares, las bases moleculares que rigen particularmente sus procesos apuntan a ser distintas y no han sido completamente elucidadas.

Planteamiento del problema

En el diseño de fármacos, la afinidad de unión de la proteína y su ligando es uno de los parámetros principales en la selección de moléculas candidatas, reflejada por el cambio en la energía libre de Gibbs de unión. Por lo que la comprensión de la naturaleza de la afinidad de las interacciones proteína-ligando, y su posterior optimización, pasa por la descripción de la firma termodinámica de la unión. Para un número creciente de interacciones de ligandos hidrofóbicos con proteínas u otras entidades químicas, se ha observado una reducción en la entalpía del sistema como contribuyente dominante en el cambio de energía de Gibbs y disminución en la capacidad calorífica del sistema, que encaja con la firma típica del efecto hidrofóbico no clásico, el cual se ha relacionado con sitios de unión hidrofóbicos en las proteínas caracterizados por tener geometría cóncava y baja densidad de agua.

El efecto hidrofóbico no clásico ha sido reportado para varias lipocalinas. Ejemplos de esto son la proteína urinaria mayor 1 de ratón (mMUP-1), la proteína de unión de odorantes 3 de rata (rOBP-3) y la proteína de unión de odorantes bovina (bOBP); en las cuales, acorde a las estructuras experimentales obtenidas, su cavidad se encuentra cerrada y aislada del solvente y que pese a presentar una firma termodinámica característica del efecto hidrofóbico no clásico, el incremento en el área superficial hidrofóbica del ligando, expresada como el aporte energético de los grupos metileno en la firma termodinámica de unión, es distinto entre estas proteínas. La reciente caracterización experimental y computacional de la bOBP reveló que el reconocimiento de su ligando endógeno, 1-octen-3-ol, está acoplado a la liberación de moléculas de agua de alta energía residentes en la cavidad de la apoproteína y, en contraste, el ligando congénico 1-hexen-3-ol libera menos moléculas de agua, lo cual impacta disminuyendo la afinidad de la unión. Adicionalmente, mediante simulaciones de dinámica molecular se identificaron 3 poros que son potenciales sitios de intercambio de agua y entrada del ligando. Los datos presentados en los estudios previos de mMUP-1 y rOBP3 no permiten distinguir las bases del comportamiento diferencial en la impronta termodinámica de unión respecto a ellas mismas y bOBP. El estudio comparativo del análisis computacional mediante simulaciones de dinámica molecular y experimental de las lipocalinas bOBP y mMUP-1 realizado en el presente trabajo, estuvo dirigido a contribuir a comprender las bases moleculares que rigen el reconocimiento de ligandos hidrofóbicos y describir los eventos que desencadenan las firmas termodinámicas específicas. El uso de dinámicas moleculares de larga duración nos permitió explorar eventos de mayor escala temporal, logrando superar la escala temporal de equilibrio de mMUP-1 libre y formando complejos. Esto resultó particularmente relevante para caracterizar el intercambio de moléculas de agua entre el seno acuoso y la cavidad formada por el barril β en la formación del complejo proteína ligando.

Hipótesis

Las diferencias en las firmas termodinámicas tipo efecto hidrofóbico no clásico exhibidas en las lipocalinas se deben a patrones distintos de solvatación en el sitio de reconocimiento de los ligandos hidrofóbicos.

Objetivo general

Elucidar el origen molecular de las diversas estrategias energéticas exhibidas por las lipocalinas en el reconocimiento de ligandos hidrofóbicos.

Objetivos específicos

- Caracterizar a través de simulaciones de dinámica molecular las propiedades conformacionales de mMUP-1 en presencia y ausencia de ligando.
- Caracterizar las propiedades de las moléculas de agua residentes en la cavidad de unión de las lipocalinas.
- Identificar los poros por los cuales hay intercambio de moléculas de agua y se da la entrada del ligando a la cavidad hidrofóbica de las proteínas mMUP-1.
- Correlacionar la caracterización computacional con las firmas termodinámicas experimentales disponibles en la literatura.

Metodología

Simulaciones por dinámica molecular

Se realizaron simulaciones de 4 μ s para cada sistema empleando la suite AMBER 16 y el campo de fuerza FF14SB (Maier *et al.*, 2015), utilizando una tarjeta gráfica GeForce RTX 2060 SUPER. Para la forma apo de mMUP se utilizó la estructura experimental con código PDB 2OZQ para mMUP-1 (Syme *et al.*, 2007), y para los complejos con pentanol y nonanol se utilizaron las estructuras con código PDB 1ZND y 1ZNK, respectivamente (Malham *et al.*, 2005). La protonación a pH 7.4 se realizó mediante los programas PDBFixer y PROPKA. Mediante PDBFixer también se añadieron los residuos y átomos no determinados en la estructura experimental (Tabla 2).

Tabla 2: Residuos y átomos agregados en la construcción de los sistemas para las dinámicas moleculares.

Proteína	Código PDB	Residuos añadidos	Átomos añadidos
mMUP-1	2OZQ, 1ZND y 1ZNK	Leu 158, Gln 159, Ala 160, Arg 161 y Glu 162	Glu 1: CG, CD, OE1, OE2 Arg 8: CG, CD, NE, CZ, NH1, NH2

Las simulaciones se generaron en solvente explícito, conservando las aguas cristalográficas presentes en las estructuras, con el modelo de agua TIP3P en una caja octaédrica y distancia mínima de 12.0 Å de la proteína al borde de la caja. Para neutralizar el sistema se colocaron contraiones de sodio (Na⁺) en posiciones aleatorias. Se utilizaron condiciones periódicas de frontera y las simulaciones corrieron en un ensamble NPT (37 °C, 1 atm). Las interacciones de largo alcance fueron calculadas con el módulo PMEMD de la suite de AMBER con el método PME (particle-mesh Ewald) con un valor de corte de 9.0 Å. Para acelerar la simulación, se habilitó el algoritmo SHAKE y se llevó a cabo el método de repartición de masa de hidrógenos (HMR), con lo que se logró elevar el tiempo de integración a 4 fs. La minimización se realizó por gradiente conjugado en 5000 ciclos, seguida por calentamiento NVT (0.8 ns) y equilibrado NPT (1 ns). Se estableció a la dinámica de Langevin como termostato durante el calentamiento, equilibrado y simulación. Los archivos de corrida se crearon con ayuda del programa pyMDmix (Alvarez-Garcia & Barril, 2014).

De acuerdo con las funciones de autocorrelación para la energía potencial y RMSD de la cadena principal de la proteína, se decidió tomar el tiempo de 1 μ s como punto de convergencia de las simulaciones, por lo que los resultados se analizaron a partir de los 3 últimos μ s de simulación. Para el análisis y visualizaciones de las trayectorias se usó el módulo CPPTRAJ de AMBER (Roe & Cheatham, 2013) y el programa UCSF CHIMERA (Pettersen *et al.*, 2004), a menos que se especifique otra cosa.

Análisis de componentes principales

Se realizó un análisis de componentes principales para la proteína en los 3 sistemas y para los dos ligandos dentro de la cavidad mediante dos aproximaciones distintas. En la proteína se evaluó la rotación de los ángulos ϕ y ψ de la cadena principal para capturar las estructuras que visitaba más frecuentemente durante la simulación y comparar los efectos del ligando sobre la flexibilidad de la proteína. Para los ligandos se utilizó el RMSD con el fin de identificar las zonas que habitaba el ligando y poder compararlas con las posiciones cristalográficas.

En ambos análisis, se alimentaron confórmeros cosechados cada 10 picosegundos de simulación, que fueron proyectados sobre el primer y segundo componente principal. Las distribuciones de probabilidad fueron utilizadas para obtener el paisaje de energía libre y los microestados habitados.

Determinación de sitios de hidratación

Los sitios de hidratación se identificaron mediante el método MDMix, el cual requiere una simulación del sistema en solvente explícito (Alvarez-Garcia & Barril, 2014). A través de la simulación se obtienen distribuciones de densidad de las moléculas de agua en el espacio. Posteriormente, las densidades de agua analizadas son convertidas a energía libre de unión para el sitio solvente (ΔG_{ss}) al compararla con la distribución que se espera por la relación de Boltzmann a través de la siguiente ecuación:

$$\Delta G_{ss}^{\circ} = -k_b T \ln \frac{N_i}{N_o}$$

donde los términos N_i y N_o corresponden a la distribución observada durante la simulación y a una distribución uniforme en el seno acuoso, respectivamente. Los sitios de hidratación de la cavidad se caracterizan por ΔG_{ss}° negativos.

El conteo e identificación de moléculas de agua al interior se llevó a cabo mediante 3 esferas de selección definidas por átomos en las hebras del barril, como se ilustra en la Figura 5.

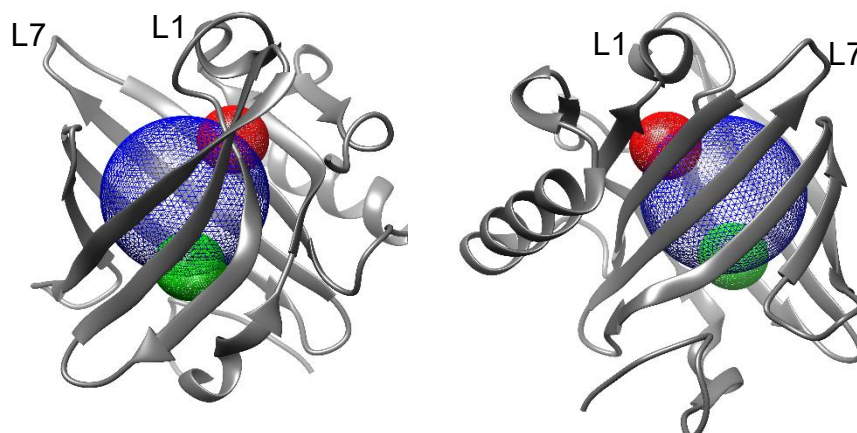


Figura 5: Esferas internas de sondeo para moléculas de agua dentro de la cavidad de unión.

Resultados

Flexibilidad conformacional de mMUP-1

A partir de las estructuras resueltas por rayos X de la proteína mMUP-1 con y sin ligandos, se realizaron simulaciones por dinámica molecular de 4 μ s para cada sistema. Para la forma apo (mMUP-1^{apo}), se utilizó la estructura con código PDB 2OZQ. Para los complejos con pentanol (mMUP-1^{pentanol}) y nonanol (mMUP-1^{nonanol}) se usaron las estructuras 1ZND y 1ZNK, respectivamente, resueltas por el mismo grupo de investigación (Malham *et al.*, 2005; Syme *et al.*, 2007). La proteína mMUP-1 posee la estructura característica de barril β antiparalelo de ocho hebras y 7 asas (Figura 6). La región de la boca se encuentra rodeada por las asas impares (L1, L3, L5 y L7), y cerrada por un puente de hidrógeno entre el hidroxilo de la cadena lateral de Y84 y el carbonilo de la cadena principal de N37. El fondo del barril lo conforman las asas pares (L2, L4 y L6), y es sellado por el motivo hélice 3_{10} en la región N-terminal. En el extremo C-terminal se encuentra una hélice α empacada contra el barril, manteniendo contactos con las hebras G y H (Kusser *et al.*, 2001).

La determinación de utilizar el modelo TIP3P para el solvente del sistema se realizó con la intención de realizar simulaciones de larga duración con un costo computacional accesible (~225 ns/día). Los campos de fuerza ff14SB y GAFF utilizados para representar la proteína y los alcoholes fueron desarrollados con TIP3P como modelo de agua de referencia (Maier *et al.*, 2015 & Wang *et al.*, 2004). A pesar de mostrar deficiencias en el comportamiento del agua en el seno acuoso, condicionando un alto coeficiente de difusión y baja viscosidad, los sistemas ff14SB y ff99SB con TIP3P reproducen buenos resultados relacionado con la termodinámica de hidratación y en la formación de complejos proteína-ligando (He *et al.*, 2020; Paschek *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2018).

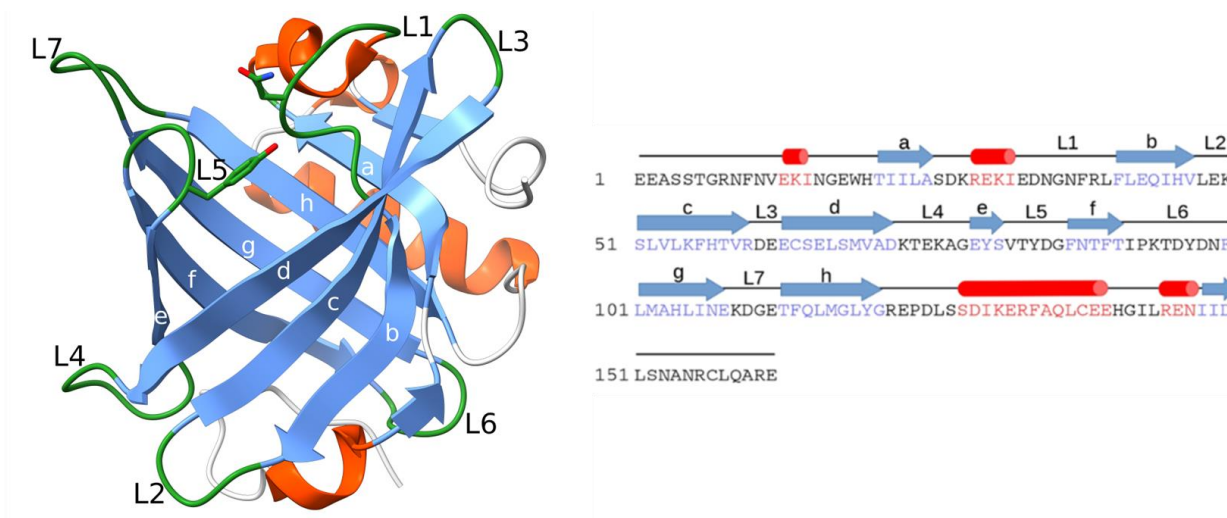


Figura 6: Estructura cristalográfica de mMUP-1 (PDB 2ozaq). Los residuos que forman elementos de la estructura secundaria se marcan en flechas para hebras β y espirales para hélices α . Las hebras que conforman el barril β se nombran de A a H, y las asas conectoras como L1 a L7. Se señalan las cadenas laterales de los residuos N37 y Y84.

Se analizaron las funciones de autocorrelación de la energía potencial y el RMSD de los carbonos α de la proteína para determinar el punto de convergencia de la simulación (Figura 7). De acuerdo con estos resultados, se eliminó el primer μ s de simulación para los tres sistemas; posterior a ese punto, los valores de la función de correlación para ambos parámetros oscilaron alrededor de cero (Figura 7). En el caso de mMUP-1^{nonanol} aparecen variaciones de mayor amplitud en las funciones de autocorrelación durante el último microsegundo de simulación, el estudio de mayores escalas temporales permite la observación de estos fenómenos. La simulación más larga reportada previamente para mMUP-1 es de 1.2 μ s (Roy & Laughton, 2010), es decir, tiempo apenas superior al tiempo de convergencia que se determinó en este trabajo. Los autores observaron que los RMSD de las cadenas principales en las dinámicas tendían a agruparse en cúmulos con transiciones unidireccionales y excluyentes entre las 3 réplicas que obtuvieron, implicando una ausencia de convergencia en las trayectorias, observación que es consistente con los análisis de autocorrelación aquí presentados.

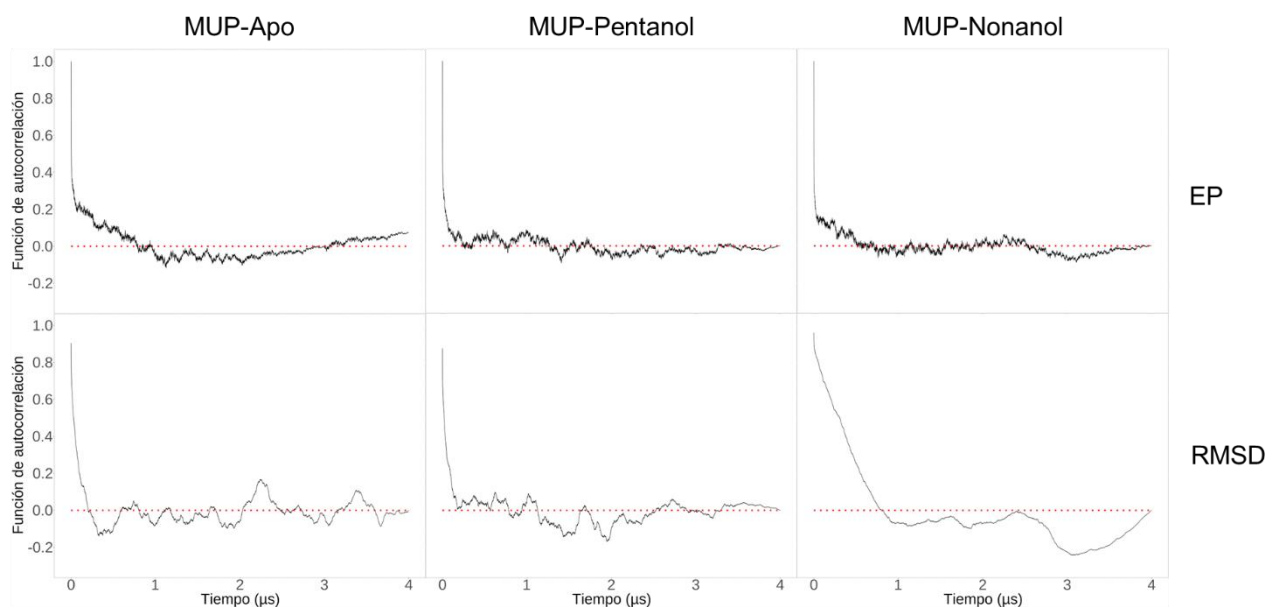


Figura 7: Diagramas de autocorrelación para la energía potencial (EP) y RMSD. **A)** mMUP-1^{apo}, **B)** mMUP-1^{pentanol}, **C)** mMUP-1^{nonanol}.

Las estructuras promedio producidas por la simulación de dinámica molecular se mantuvieron relativamente estáticas en la zona del barril, con valores bajos de RMSD en la cadena principal al compararlas con las estructuras experimentales: 1.1 Å para mMUP-1^{apo}, 1.2 Å para mMUP-1^{pentanol} y 1.2 para mMUP-1^{nonanol} (Figura 8A). Claramente, es en los extremos C y N terminal donde se encuentran las mayores desviaciones. Por parte del barril, las asas L3 y L7 presentan la mayor variación respecto a la estructura experimental.

El RMSD de los átomos de la cadena principal del barril β (residuos 10-120) respecto al tiempo de simulación mostró valores oscilantes alrededor de los 2 Å (Figura 8B), con dos eventos de

alto RMSD, mayor a 2.5 Å, en el sistema mMUP-1^{apo} con duraciones menores a 200 ns. Particularmente el RMSD de mMUP-1^{nonanol} incrementó por arriba de 2 Å de manera sostenida después de los 3 μs, y se mantuvo hasta el final de la simulación. Este incremento fue producido por las asas L4 y L7. En el caso de mMUP-1^{pentanol}, el incremento fue gradual y no destacaron eventos en particular.

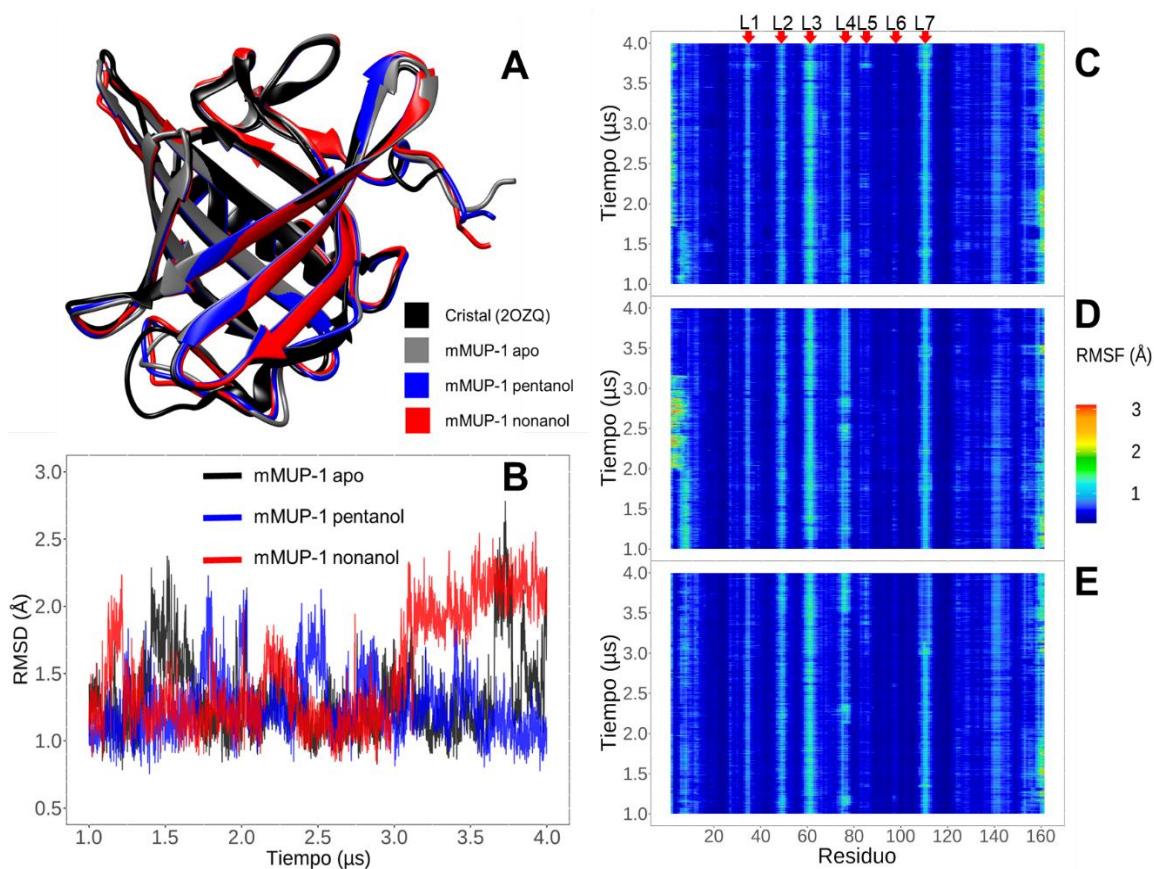


Figura 8: Comportamiento de la cadena principal de mMUP-1. **A)** Estructuras promedio de las simulaciones comparadas con la estructura cristalográfica de mMUP-1^{apo}. **B)** RMSD de la cadena principal. **C),D),E)** RMSF por residuo vs tiempo de simulación para mMUP-1^{apo}, mMUP-1^{pentanol}, mMUP-1^{nonanol}, respectivamente.

Para determinar la evolución de movilidad en las distintas regiones de la proteína, se calculó el RMSF de la cadena principal (Figuras 8C-E). Se observó que los residuos que conforman las asas L3 y L7 contribuyen mayoritariamente a la movilidad de la proteína, mientras que, en términos generales, las hebras se mantuvieron relativamente estáticas. El asa L5, una de las regiones directamente involucradas con la boca del barril, presentó baja fluctuación estructural, con eventos cortos y espaciados posiblemente relacionados con la formación de poros. El incremento del RMSD de mMUP-1^{nonanol} posterior a los 3 μs puede explicarse a través de la pérdida de estabilidad de, por un lado, los residuos que conforman L7, observándose el cambio justo alrededor del tercer microsegundo y de, por el otro, los residuos de L4 a los 3.5 μs.

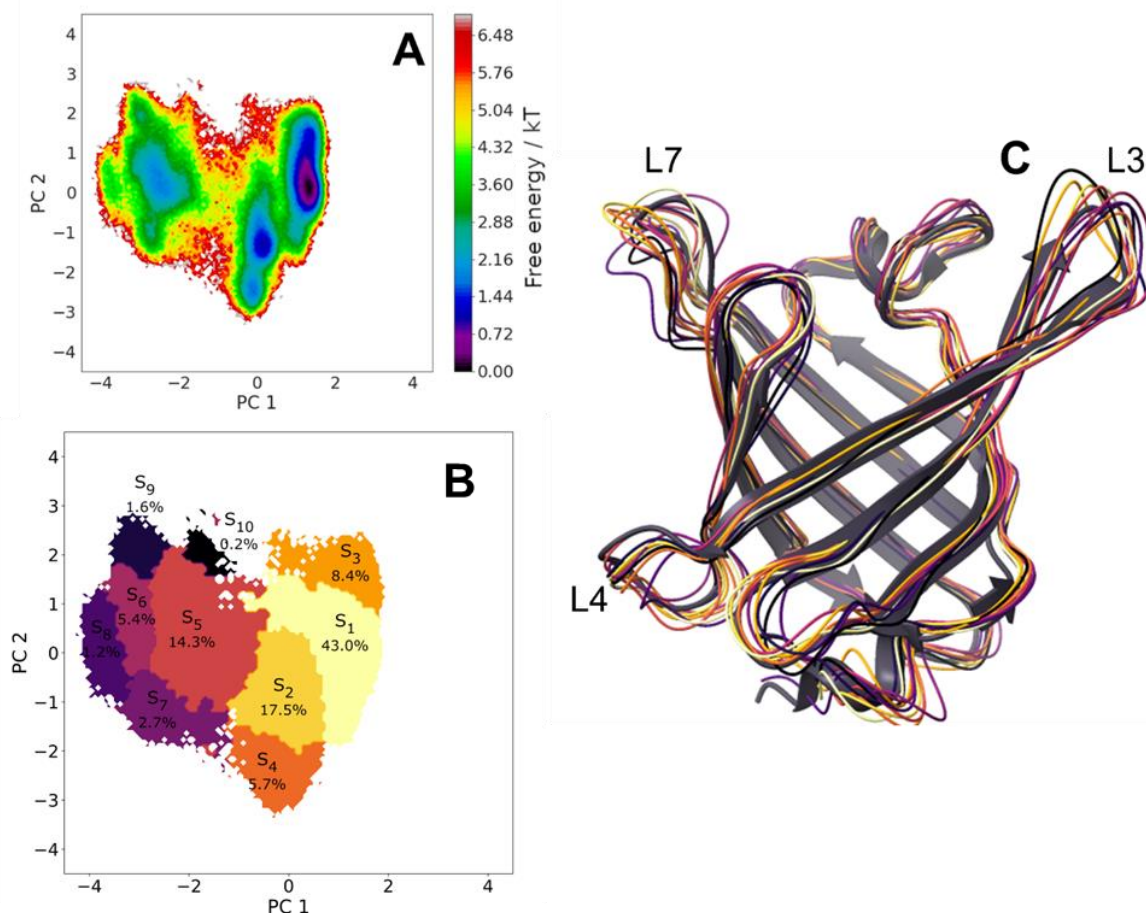


Figura 9: Análisis conformacional del barril del sistema mMUP-1-apo sobre los ángulos diedros φ y ψ . **A)** Paisaje de energía libre de la proyección sobre los dos primeros componentes. **B)** Estados generados a partir del agrupamiento de conformeros. **C)** Conformeros obtenidos de las cuencas de atracción en los estados agrupados.

El análisis de componentes principales permite plasmar el paisaje conformacional de la proteína a partir de las coordenadas internas proporcionadas por los ángulos diedros φ y ψ de los 3 sistemas, usualmente haciendo la proyección de las trayectorias sobre los primeros 2 componentes principales que, por definición, corresponden a los de mayor amplitud de variación conformacional. De las Figuras 9 a 11, se puede observar que las perturbaciones provocadas por los ligandos, ya sea pentanol o nonanol, permitieron que la proteína explorara más estados conformacionales con respecto a mMUP-1^{apo}, con cuencas de atracción menos dominantes. Para la forma apo se identificaron 10 estados, donde el estado dominante (S_1) acumuló el 43% de las conformaciones muestreadas (Figura 9). El segundo estado más abundante (S_2) contuvo 19% de los conformeros. La inspección de estructuras correspondientes al centroide de los 10 estados mostró mayores variaciones en las asas L3 y L7, las cuales son particularmente móviles en las simulaciones realizadas. De manera similar, en el complejo con pentanol se determinaron 10 estados (Figura 10). El paisaje de energía libre mostró 2 cuencas de atracción principales determinadas por los estados S_1 y S_2 con el 29.4 y 24.4% de conformeros, respectivamente. En este complejo, se observó la participación del asa L4 en la variación conformacional, la cual

durante las simulaciones de mMUP-1^{apo} adoptó conformaciones similares en los distintos estados. Finalmente, para mMUP-1^{nonanol} se determinaron 13 estados, S_4 agrupando la mayor cantidad de conformeros analizados (33.5%). Particularmente, se observó una región conformada por S_1 y S_3 poblada principalmente por estructuras muestreadas durante el último microsegundo de simulación (Figura 11). La mayor apertura en el paisaje conformacional de mMUP-1^{nonanol} se produjo a partir de la variación de las conformaciones de L4 y L7, como se observa en los centroides de los distintos estados.

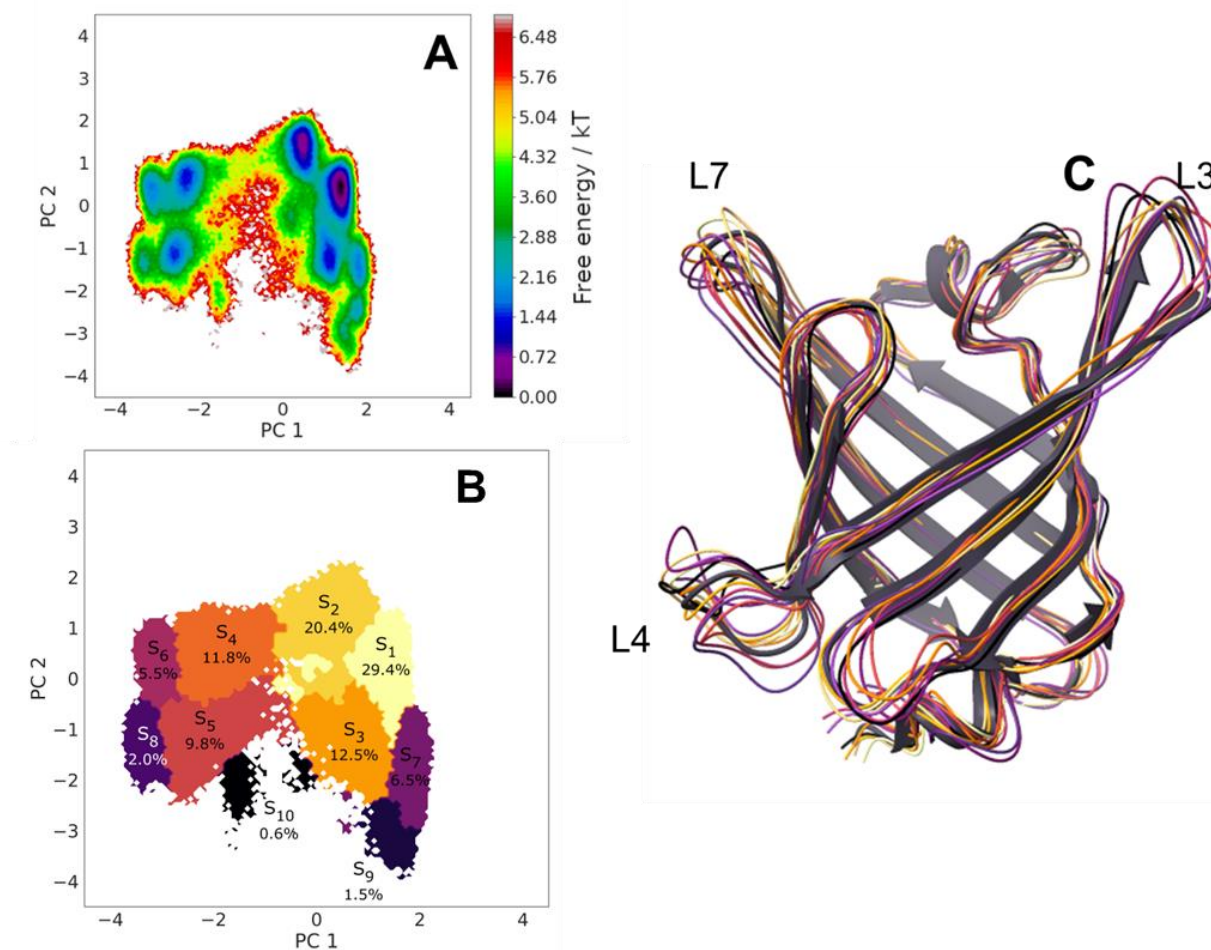


Figura 10: Análisis conformacional de los ángulos diedros ϕ y ψ del barril β de mMUP-1^{pentanol}. **A)** Paisaje de energía libre de la proyección sobre los dos primeros componentes. **B)** Estados generados a partir del agrupamiento de conformeros de la simulación de DM. **C)** Conformeros obtenidos de las cuencas de atracción en los estados agrupados.

La varianza entre los conformeros de las simulaciones la podemos cuantificar a partir de la magnitud de los valores propios (o eigenvalores) de los componentes principales (Figura 12). Los primeros tres componentes principales del complejo con nonanol poseen mayor variación que mMUP-1^{apo} y mMUP-1^{pentanol}, reflejado por sus eigenvalores y explicada a partir de la alta movilidad de las asas L4 y L7, en concordancia con las fluctuaciones expuestas en la Figura 8. Adicionalmente, la mayor cantidad de macroestados apoyan la mayor variabilidad

conformacional de mMUP-1^{nonanol}. A pesar de la diferencia de movilidad del asa L4, mMUP-1^{apo} y mMUP-1^{pentanol} poseen varianzas similares en el motivo de barril β , compensada por la rigidez de los residuos de la hebra D y el asa L5. Estos resultados son comparables con los presentados en otras simulaciones, donde particularmente las asas L3, L4 y L7 son más flexibles independientemente del ligando utilizado, mientras que los residuos de L2, L5 y la hebra E se mantienen más rígidos (Macek *et al.*, 2007; Roy & Laughton, 2010, Huai *et al.*, 2021). La compensación entrópica por parte del aumento de flexibilidad frente a residuos que presentan menor movimiento al unir ligandos es un fenómeno reportado por experimentos de resonancia magnética nuclear, donde L3 y L4 contribuyen favorablemente a la entropía de unión. Desafortunadamente, la diferencia en los tiempos muestreados mediante espectroscopía y simulaciones de DM representan una barrera para la comparación directa de ambos resultados.

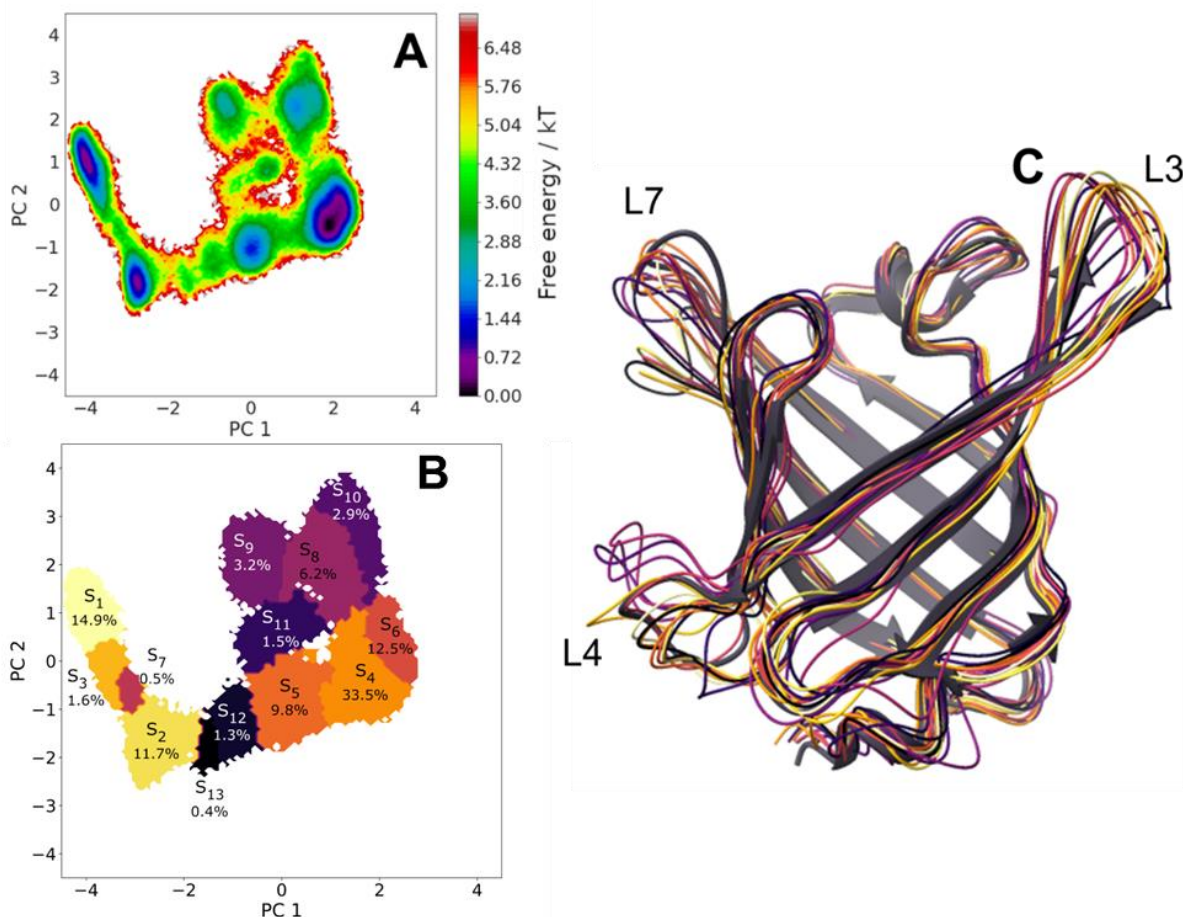


Figura 11: Análisis conformacional del barril del sistema mMUP-1-pentanol sobre los ángulos diedros φ y ψ . **A)** Paisaje de energía libre de la proyección sobre los dos primeros componentes. **B)** Estados generados a partir del agrupamiento de conformeros. **C)** Conformeros obtenidos de las cuencas de atracción en los estados agrupados.

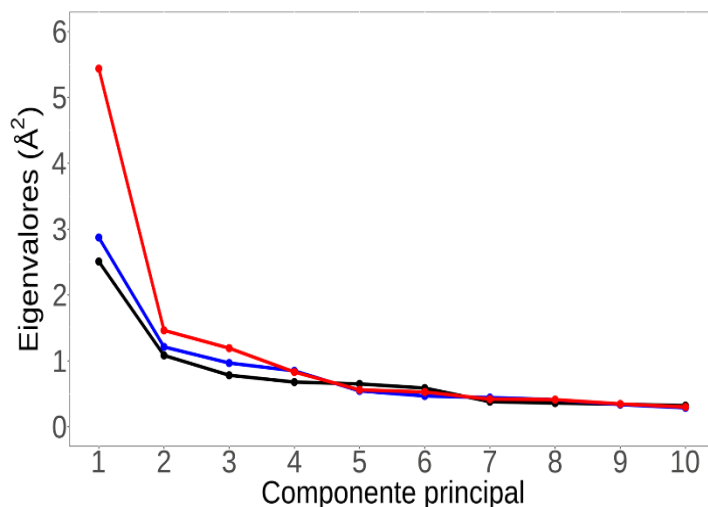


Figura 12: Eigenvalores para los diez primeros componentes principales de los ángulos diedro de la cadena principal para mMUP-1^{apo} (negro), mMUP-1^{pentanol} (azul) y mMUP-1^{nonanol} (rojo).

Movilidad de ligandos dentro de la cavidad de mMUP-1

La cavidad de mMUP-1 posee un gran volumen, cercano a los 500 Å³, comparado con el de los alcoholes, 87 Å³ para pentanol y 144 Å³ para nonanol (Jayaram *et al.*, 2012), aunado a que hay pocos sitios hidrofílicos en la cavidad de la proteína para fijar al grupo hidroxilo. Por lo que fue de interés el monitoreo de la movilidad de los ligandos en la cavidad de unión. Para ello, se realizó el análisis de componentes principales sobre el RMSD de los átomos pesados del ligando manteniendo el movimiento rotacional y traslacional de las moléculas. Como es de esperarse, el tamaño del ligando Influencia la libertad de movimiento para estos dos alcoholes durante las simulaciones.

El paisaje conformacional de los alcoholes fue proyectado sobre los dos primeros componentes principales. En ambos casos, se encontraron estados muy cercanos a las posiciones cristalográficas reportadas en las estructuras de referencia. Para el pentanol (Figura 13), se definieron 4 estados; los dos más poblados, denominados S₄ y S₃, agruparon el 72.1 % de estructuras. En ellos, la orientación del grupo hidroxilo y la cadena alifática coincidieron cercanamente con alguno de los dos conformeros de pentanol reportados experimentalmente, permitiendo la interacción entre el grupo hidroxilo con Y120 o F38 mediante puentes de hidrógeno. En los dos estados minoritarios se mantuvo la orientación del hidroxilo hacia Y120 o F38, tendiendo a mantener la interacción con esos residuos, pero la cadena de carbonos se encontró desplazada con respecto a las posiciones cristalográficas.

El análisis de componentes principales del nonanol (Figura 14) mostró dos estados altamente poblados donde las estructuras del centroide fueron cercanas al confórmero experimental y abarcaron el 98.9%. Esto permitió el acomodo de la cadena alifática hacia el fondo del barril formado por residuos de fenilalanina, leucina e isoleucina, a través de los cuales mantuvo contactos estables con la proteína, mientras el grupo hidroxilo conservó el puente de hidrógeno con F38. Los dos estados restantes mostraron al nonanol habitando diferentes regiones de la proteína que impidieron la formación de contactos hidrofílicos estables. La baja prevalencia de estos estados son un indicativo de la baja estabilidad del nonanol fuera de la posición marcada por la estructura cristalográfica.

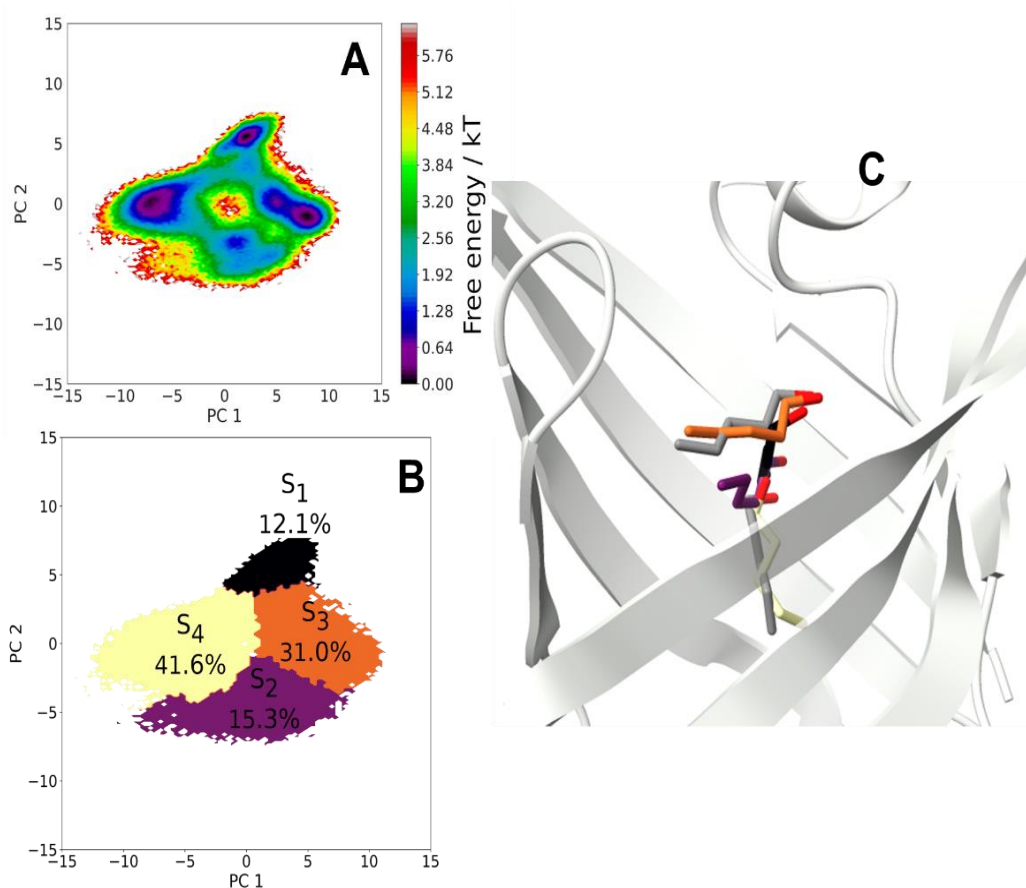


Figura 13: Análisis del RSMD del pentanol. **A)** Paisaje de energía libre de la proyección sobre los dos primeros componentes. **B)** Estados generados a partir de un análisis de agrupamiento de confórmeros. **C)** Confórmeros obtenidos de las cuencas de atracción en los estados agrupados, coloreados de acuerdo al código de colores utilizado en el panel B. Para su comparación, en gris se muestran los ligandos resueltos en la estructura cristalográfica.

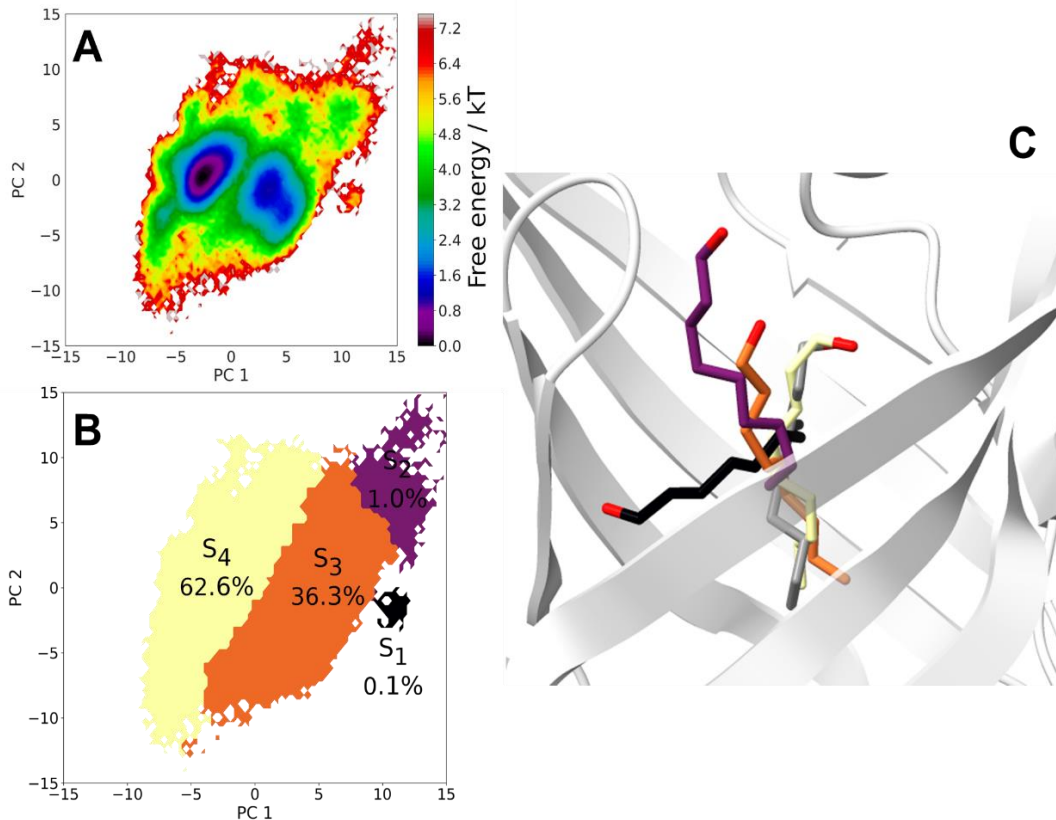


Figura 14: Análisis del RSMD del nonanol. **A)** Paisaje de energía libre de la proyección sobre los dos primeros componentes. **B)** Estados generados a partir de un análisis de agrupamiento de conformeros. **C)** Conformeros obtenidos de las cuencas de atracción en los estados agrupados, coloreados de acuerdo al código de colores utilizado en el panel B. Para su comparación, en gris se muestran los ligandos resueltos en la estructura cristalográfica.

Los contactos persistentes con las cadenas laterales de residuos hidrofóbicos con el nonanol, en contraste con los contactos mostrados por el pentanol (Figura 15), le confirieron mayor estabilidad posicional. Comparativamente, todos los contactos que estableció el pentanol con la proteína se presentaron en igual o mayor magnitud con el nonanol, al cual se le adicionaron los residuos I15, I92 y L116. Las dinámicas mostraron un claro incremento en el contacto del ligando con distintos residuos de leucina de las posiciones 40, 54 y 101, 116, la alanina 103 y las isoleucinas 45 y 92. Las cadenas laterales de L54, I42 e I92 estuvieron orientadas a la parte inferior del barril, la cual es una región que no posee átomos hidrofílicos cercanos. El tamaño del pentanol no le permitió explorar esta región sin perder la orientación hacia Y120, por lo que sus contactos se concentraron en la parte central de la cavidad de la proteína.

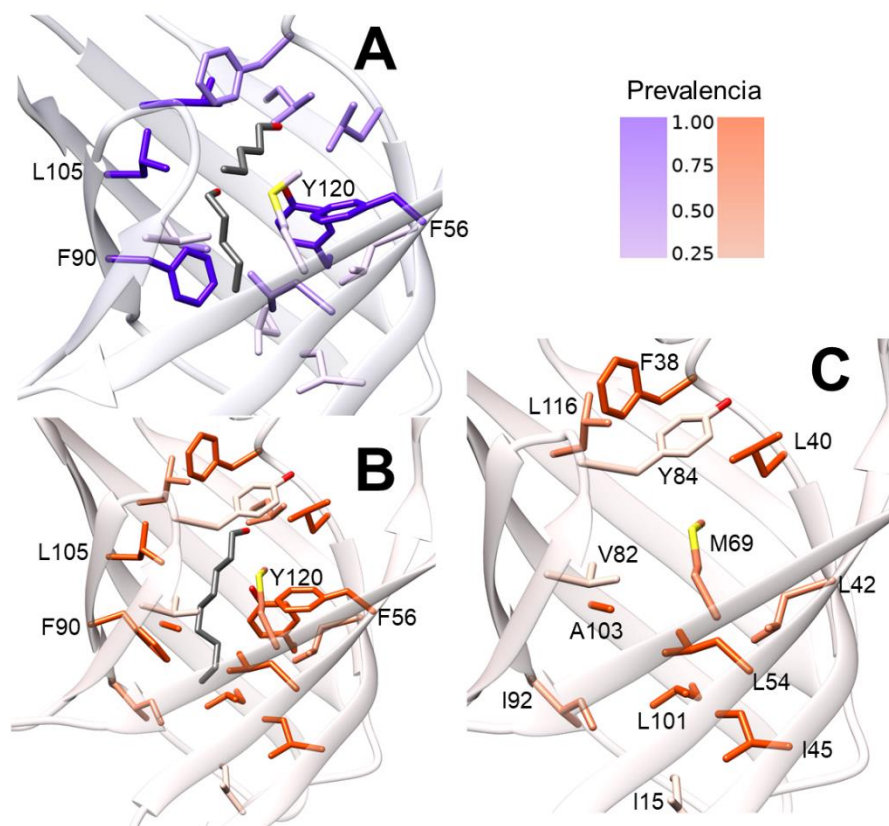


Figura 15: Prevalencia de los contactos de **A)** pentanol (morado) y **B)** nonanol (naranja) con los residuos de la cavidad. **C)** Residuos que presentan contacto con nonanol con diferencias superiores a 0.25 en la prevalencia de contactos respecto a su análogo con pentanol.

Se determinó la orientación del átomo de oxígeno del grupo hidroxilo presente en los alcoholes en la cavidad mediante un vector partiendo de la cadena alifática C_n al átomo de oxígeno del grupo hidroxilo (Figura 16). Las distribuciones mostraron una clara orientación del hidroxilo hacia los átomos con los que puede generar puentes de hidrógeno, como son el hidroxilo de Y120 y el carbonilo de F38. El pentanol presentó mayor variabilidad en sus distribuciones y posiciones, que favorecieron la asociación con cualquiera de los 2 átomos, mientras que el nonanol se asoció preferentemente con el residuo F38, tal y como se observa en la estructura cristalográfica. Los puentes de hidrógeno formados por el ligando corroboran esta observación (Figura 16B). Mientras que el pentanol permaneció rotando entre posiciones que enlazan con Y120 y F38 durante el 40% de dinámica para cada uno, el nonanol lo realizó exclusivamente con F38, no ocupando las regiones de Y120, contribuyendo a explicar mejor las diferencias de movilidad entre los ligandos. En ambos casos existió una contribución importante por parte de una molécula de

agua en la cavidad, a pesar de ser considerada una proteína con la cavidad virtualmente deshidratada (Homans, 2007).

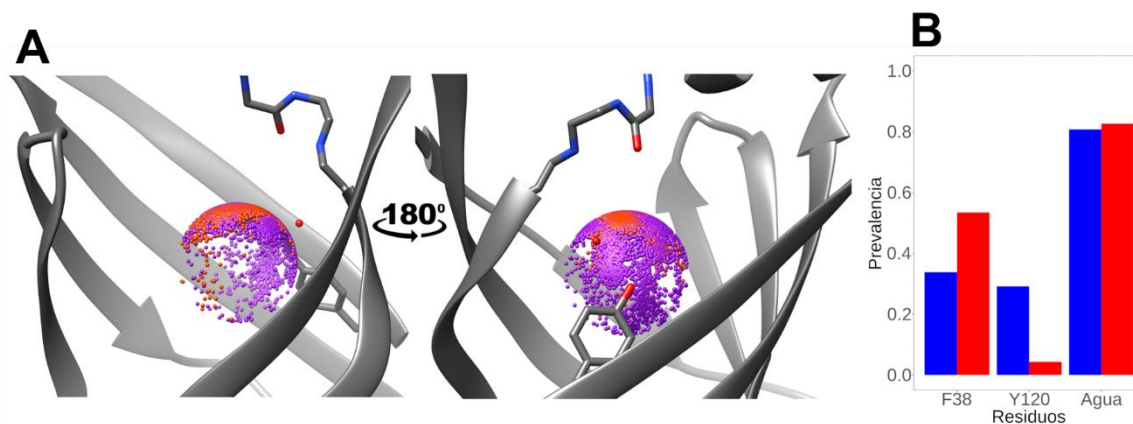


Figura 16: A) Orientación del vector C_n a O de los alcoholes pentanol (morado) y nonanol (naranja), se representa la cadena lateral de Y120, el carbonilo de F38 y la molécula de agua presente en los complejos cristalográficos. **B)** Principales participantes en los puentes de hidrógeno con los ligandos pentanol (azul) y nonanol (rojo).

Hidratación interna de mMUP-1

Las dinámicas mostraron que existe una molécula de agua presente y aporta interacciones electrostáticas con el ligando más estables que cualquier residuo de la proteína. La disminución de la entropía por las restricciones del nonanol en la cavidad fueron compensadas por interacciones más estables con las regiones alifáticas de la proteína, influenciadas por el tamaño del ligando que le permitió asociarse simultáneamente con más residuos de la cavidad que lo que fue posible para el pentanol. El pentanol, en cambio, exploró más conformaciones y regiones sin establecer contactos e interacciones notables a excepción de la molécula de agua en la cavidad.

La estructura cristalográfica de la apoproteína presenta dentro de la cavidad 4 moléculas de agua que forman 6 puentes de hidrógeno en total. La mitad de ellos involucran la interacción de una molécula de agua y un residuo de aminoácido de la proteína, los 3 restantes se forman entre las moléculas de agua. El oxígeno de la Tyr120 participa en uno de ellos, los otros dos involucran oxígenos de la cadena principal (Phe38 y Leu40). El puente de hidrógeno del hidroxilo de la tirosina se mantiene con los ligandos cristalográficos, pentanol y nonanol, y permite el acomodo de la molécula de agua entre el ligando, la cadena lateral de Tyr120 y el carbonilo de la cadena principal del residuo Leu40. A partir de las simulaciones, el método de MDMix (Alvarez-García & Barril, 2014) reprodujo dos sitios de hidratación de la apoproteína que coinciden con 2 aguas cristalográficas. El primer sitio, con energía < -0.9 kcal/mol, está a la distancia suficiente para establecer puentes de hidrógeno con Tyr120 y Leu40. El segundo sitio de hidratación se resolvió con una energía alrededor de -0.6 kcal/mol, el cual forma un puente de hidrógeno con Phe38. En los complejos, el grupo hidroxilo del ligando reemplazó el sitio de hidratación secundario de

manera parcial por parte del pentanol que se desplazó dentro de la cavidad y de manera total para el nonanol. El sitio de hidratación primario fue conservado en la apoproteína y los complejos, el cual es coincidente con el agua cristalográfica. En ambos casos la energía de unión rondó -1.0 kcal/mol (Figura 17).

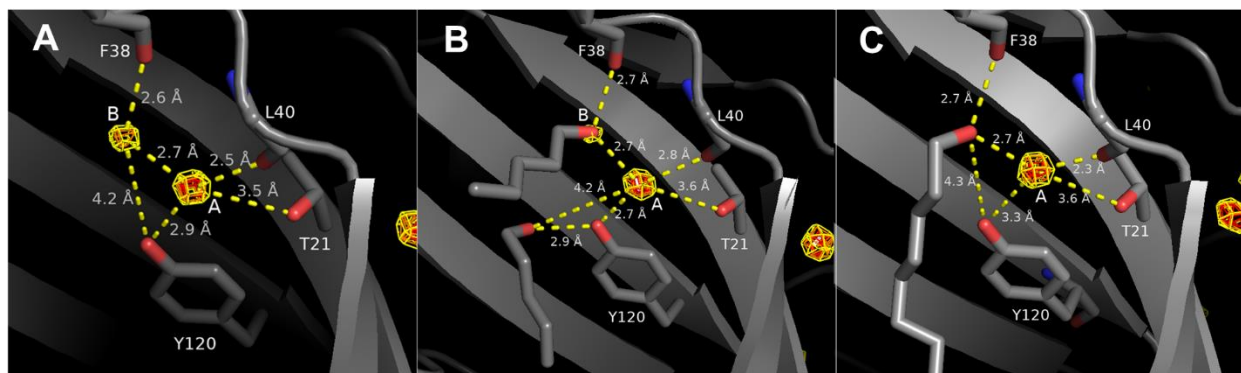


Figura 17: Sitios de hidratación determinados a partir de las dinámicas. **A)** mMUP-1-*apo*, **B)** mMUP-1-*pentanol* y **C)** mMUP-1-*nonanol*

En otras estructuras de mMUP-1 resueltas experimentalmente, ambos sitios de hidratación aparecen constantemente, tanto en apoproteínas como en complejos de distintas naturalezas. En la Figura 18 se observan comparaciones de los sitios de hidratación con aguas cristalográficas de estructuras apo, con la serie de n-alcoholes y derivados sintéticos de hormonas como el secbutil tiazol e hidroximetil heptanona. El número de moléculas de agua cristalográfica suele estar entre 1 o 2, exceptuando los casos de la estructura sin ligando 2OZQ (Figura 18A, esferas aguamarinas) que cuenta con 4 y el complejo con heptanol (Figura 18B, esferas púrpuras), que presenta 3 moléculas de agua. En todas las estructuras experimentales, las aguas cristalográficas caen dentro de los sitios de hidratación resueltos de las dinámicas moleculares, excepto el complejo con hexanol (Figura 18B, esfera verde). La molécula de agua atípica encontrada en la estructura cristalográfica de mMUP-1 y hexanol no forma ningún puente de hidrógeno. Los sitios de hidratación encontrados a partir de las simulaciones permiten establecer contactos con diversos residuos de la proteína, lo cual es escaso en la cavidad de mMUP-1 por la abundancia de residuos alifáticos y voluminosos orientados hacia al interior. Por ello, la preferencia de las moléculas de agua a agruparse en esos puntos específicos es independiente de la presencia y naturaleza de los ligandos.

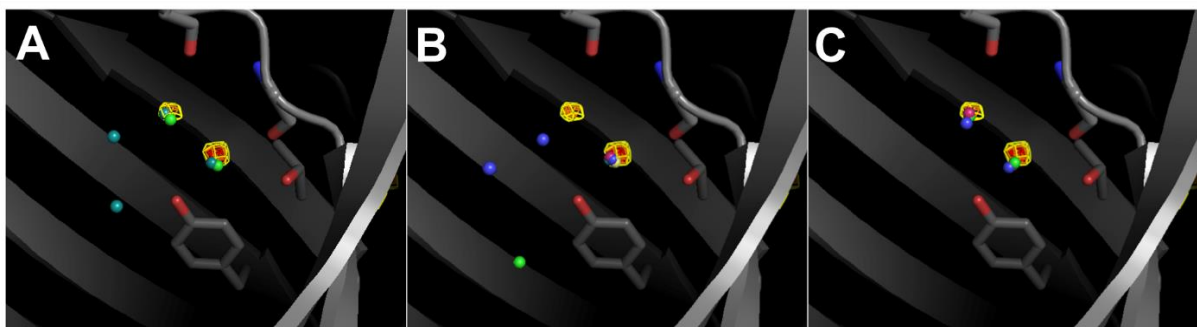


Figura 18: Comparación entre los sitios de hidratación y aguas cristalográficas de estructuras **A)** mMUP-1 apo, **B)** en complejo con alcoholes y **C)** en complejo con derivados de hormonas.

Las moléculas de agua mantuvieron transiciones constantes a través de los sitios de hidratación. A pesar de que la presencia de agua es persistente, se observó intercambio entre distintas moléculas de agua (Figura 19). Los tiempos de vida medio oscilaron alrededor de los 100 ps para el sitio primario y 50 ps para el secundario. Estos tiempos de recambio se asemejan a tiempos reportados para moléculas de agua en las capas de solvatación de proteínas (Gallo, 2018). Los hidroxilos de los alcoholes observados contribuyeron a fijar el agua al sitio de hidratación primario. Por lo general, el grupo hidroxilo estuvo orientado hacia moléculas de agua en el sitio primario de hidratación, posibilitando la formación de puentes de hidrógeno, asemejando las poses de los ligandos cristalográficos. El caso opuesto se presentó para el sitio secundario de hidratación, el cual, como se resaltó anteriormente, se encontró desplazado parcialmente por los ligandos, en mayor magnitud por el nonanol. Este último ligando, al mantenerse más estático en la cavidad, ocupó esta posición durante más tiempo de simulación.

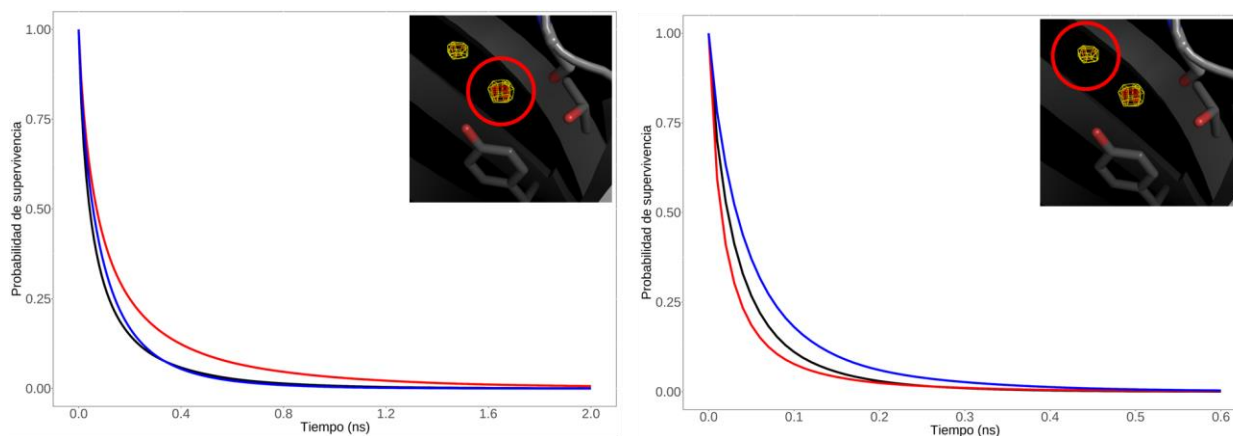


Figura 19: Tiempo de residencia de las moléculas de agua en el **A)** sitio primario de hidratación y **B)** sitio secundario de hidratación para mMUP-1^{apo} (negro), mMUP-1^{pentanol} (azul) y mMUP-1^{nonanol} (rojo). La probabilidad de supervivencia indica la probabilidad de que una molécula de agua permanezca en los sitios de hidratación por una cantidad determinada de tiempo (Liu et al., 2004)

Otra forma de corroborar diferencias en los sitios de hidratación es la distribución de frecuencia radial de átomos de la cavidad respecto a oxígenos de moléculas de agua. La Figura 20A-C

muestra los gráficos de los tres residuos en mayor interacción con el agua. En el caso del hidroxilo de Tyr120, el átomo más hidrofílico de la cavidad, el nonanol, parece ayudar a fijar a las moléculas de agua de la primera capa de hidratación, al interactuar simultáneamente con la misma molécula de agua, con un pico más pronunciado a ~ 2.7 Å. Resultados similares han sido reportado en otras simulaciones (Roy & Laughton, 2010). En cambio, el pentanol, al formar puentes de hidrógeno directamente con Tyr 120, disminuye la hidratación del residuo. El sitio de hidratación primario está en posición tanto de interactuar con el residuo de tirosina, como con Leu40, esto se traduce en un gráfico RDF bastante estable en las 3 simulaciones. En cambio, Phe38 es utilizado para sondear el sitio de hidratación secundario, donde la presencia del ligando desplaza la molécula de agua que se presenta de manera más usual en la apoproteína, disminuyendo la magnitud del primer pico, siendo más considerable la disminución cuando el nonanol forma el complejo con la proteína. El segundo pico en Phe38 es indicativo del primer sitio de hidratación y mantiene una señal sostenida en las 3 simulaciones a ~ 4.8 Å de oxígeno del carbonilo.

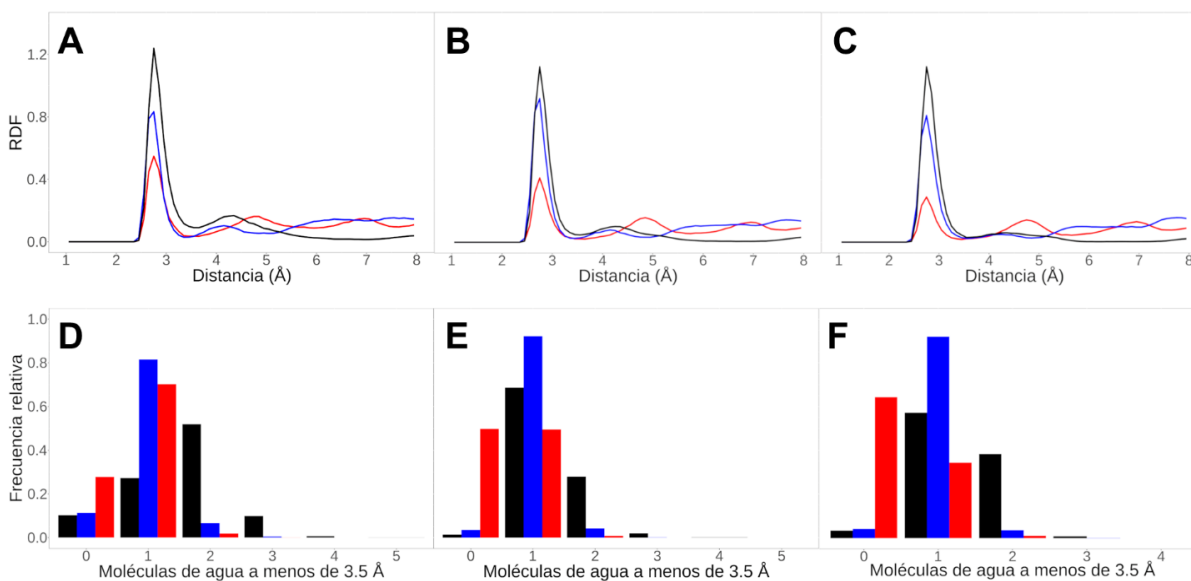


Figura 20: Funciones de distribución radial para moléculas de agua y distribución de moléculas de agua a menos de 3.5 Å de los residuos Tyr120 (negro), L40 (azul) y F38 (rojo), para los sistemas A) y D) mMUP-1-apo, B) y E) mMUP-1-pentanol y C) y F) mMUP-1-nonanol.

La presencia de moléculas de agua es importante para las interacciones de la proteína y del ligando. Siendo mMUP-1 una proteína con una cavidad que se ha considerado subóptimamente hidratada (Barrat *et al.*, 2005; Homans, 2007), determinar la naturaleza y magnitud de esa hidratación es esencial para entender su efecto sobre el reconocimiento molecular. En la Figura 21 se muestra el número de moléculas de agua en función del tiempo encontradas dentro de la cavidad durante la simulación de la apoproteína. La presencia de un determinado número de moléculas de agua secuestradas no es estable, alcanzando hasta 14 moléculas agrupadas simultáneamente, y momentos donde la cavidad se encuentra prácticamente vacía, oscilando entre 0 y 2 moléculas de agua. El promedio de toda la trayectoria fue de $N_w = 4.2 \pm 2.6$ cuando no se presenta un ligando en la cavidad. La formación de puentes de hidrógeno por molécula de

agua es útil en la descripción de las propiedades energéticas del agua cautiva. El número promedio de puentes de hidrógeno por molécula de agua fue de 2.2 ± 0.5 , el cual es significativamente menor al promedio que se presenta en el seno acuoso (3.5 ± 0.9) (Gómez-Velasco *et al.*, 2020). Por tanto, estas aguas intracavidad, al ser liberadas al seno acuoso, pueden formar nuevos puentes de hidrógeno que contribuyan al cambio favorable en la entalpía global.

La hidratación en ambos complejos se vio reducida comparada con la proteína apo, siendo para pentanol $N_w = 2.6 \pm 1.7$ y para nonanol $N_w = 2.2 \pm 1.3$. Las moléculas de agua residentes en la cavidad mantuvieron un número similar de puentes de hidrógeno $N_{HB} = 2.4 \pm 0.6$ y $N_{HB} = 2.5 \pm 0.6$, respectivamente. A pesar de los cuatro grupos metílenos extra, las simulaciones no mostraron una pérdida adicional de moléculas de agua del nonanol con respecto al pentanol. Es decir, el tamaño del ligando no fue un factor predominante para modificar la hidratación de la cavidad de mMUP-1, simultáneamente manteniendo esas moléculas en redes de puentes de hidrógeno de magnitud similar. En cambio, la bOBP sí muestra una dependencia con el tamaño de ligando, liberándose en promedio una molécula de agua adicional por metileno (Gómez-Velasco *et al.*, 2020).

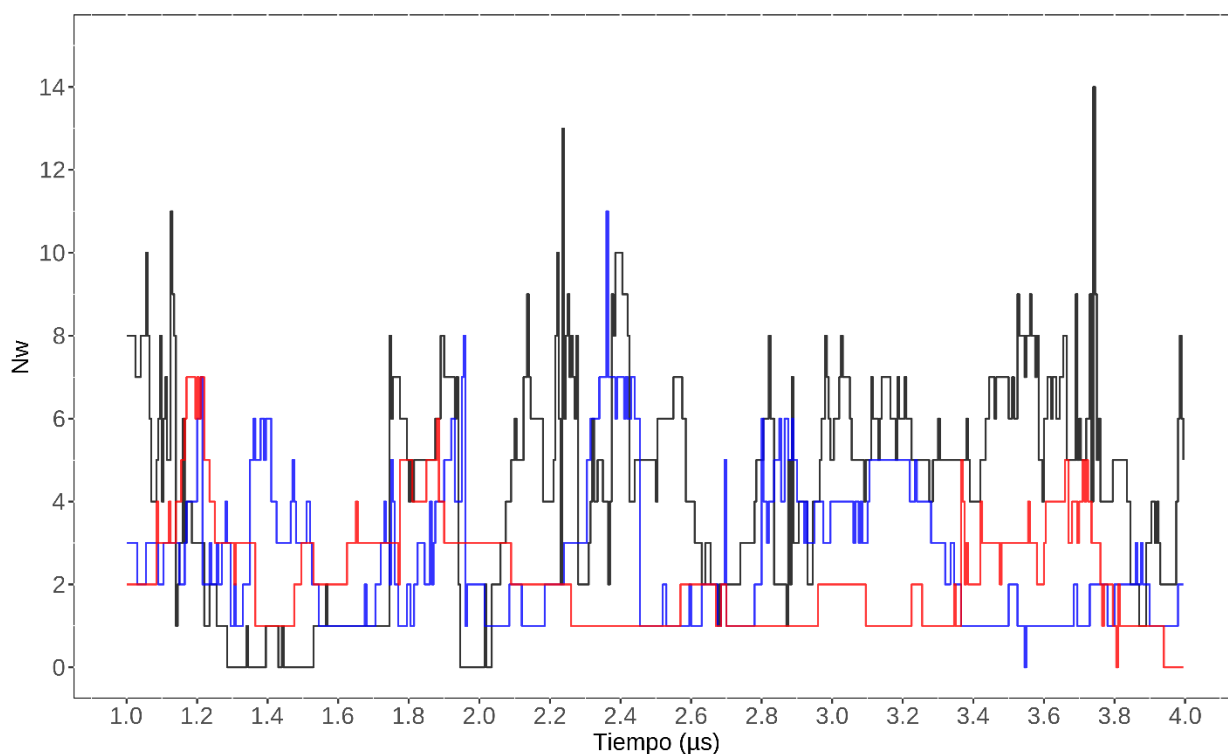


Figura 21: Moléculas de agua en la cavidad en función del tiempo de trayectoria para mMUP-1^{apo} (negro), mMUP-1^{pentanol} (azul) y mMUP-1^{nonanol} (rojo).

Las distribuciones de agua en la cavidad no mostraron una clara tendencia en mMUP-1-apo en poblaciones particulares de agua, con distribuciones favorecidas entre 0 y 7 moléculas de agua (Figura 22). Los complejos favorecieron la hidratación mínima de la cavidad, aislando entre 1 y 3 moléculas de agua durante el mayor tiempo de la dinámica, y abatiendo tiempos donde la proteína permanece deshidrata, los cuales fueron observados con mayor frecuencia en mMUP-1^{apo}. De acuerdo con las mediciones y los sitios de hidratación reportados, en promedio mMUP-1^{apo} presentó dos moléculas de agua estructuradas con características similares a aguas solvatantes y 2 moléculas altamente móviles, desplazándose libremente por la cavidad e intercambiándose con las aguas de los sitios de hidratación. En el caso de los complejos, en promedio, perdieron un agua estructurada y otra móvil, sin diferencias claras de hidratación entre ellos.

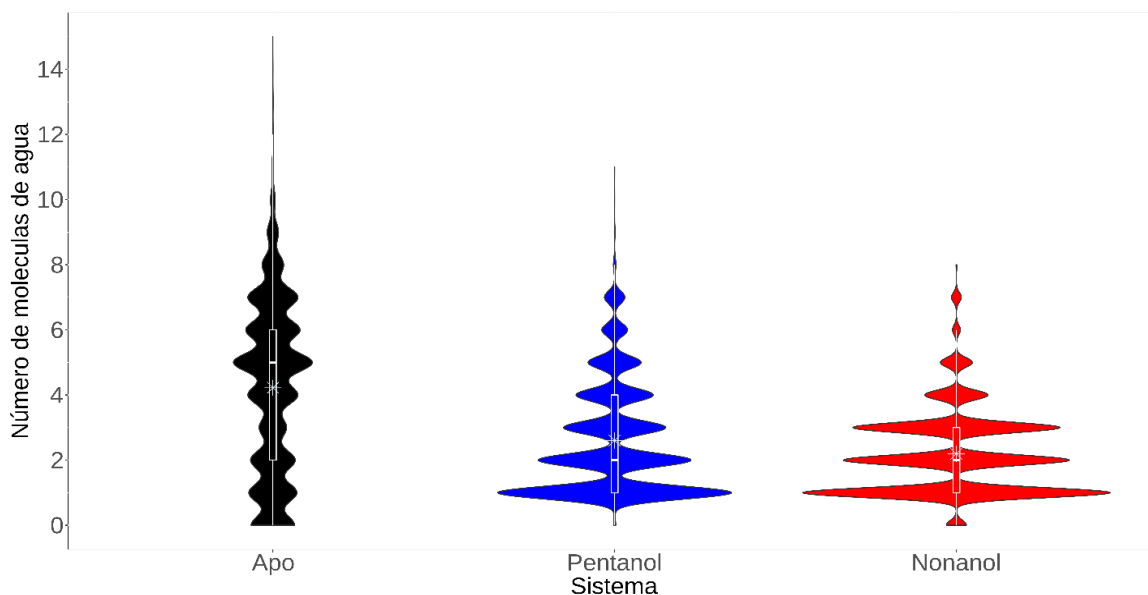


Figura 22: Distribución de moléculas de agua en la cavidad de mMUP-1.

Las moléculas de agua de alta energía presentan energía coulombica y de van der Waals menos favorable que sus contrapartes en el seno acuoso, influenciadas por el ambiente hidrofóbico en el que se encuentran aisladas. Las moléculas retenidas en los 3 sistemas de mMUP-1 simulados formaron menos puentes de hidrógeno en promedio y su energía coulombica fue menos favorable de la que se espera en el seno acuoso, de acuerdo con la Figura 24. Las interacciones de van der Waals, a pesar de que resultaron más favorables en el interior de mMUP-1, no fueron suficientes para compensar las interacciones coulombicas no formadas.

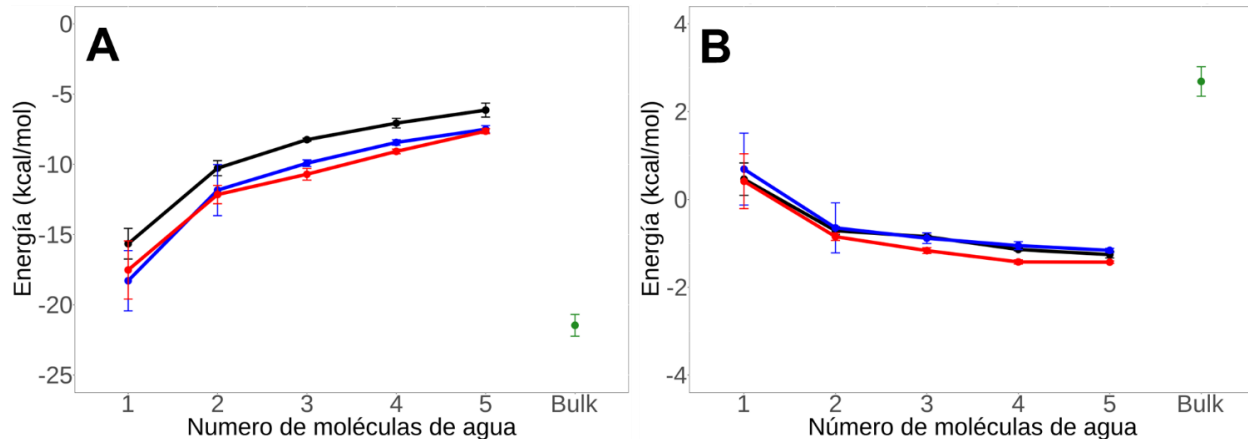


Figura 23: A) Energía coulombica y B) de van der Waals por molécula de agua en la cavidad de mMUP-1 en función del número de aguas presentes. para mMUP-1^{apo} (negro), mMUP-1^{pentanol} (azul) y mMUP-1^{nonanol} (rojo).

Mecanismo de intercambio de moléculas de agua entre el seno acuoso y la cavidad de mMUP-1

Durante la simulación de la proteína apo se identificó una región que funciona como poro principal, ubicada en la región de la boca, a través del cual se observó intercambio de agua de la cavidad con el agua en el seno acuoso. El poro se formó principalmente por la separación de las asas L1 y L5, las cuales permanecieron unidas la mayor parte del tiempo por la formación de un puente de hidrógeno entre el grupo hidroxilo de la Tyr84 en L5 y el grupo carbonilo de la cadena principal del residuo de Asn37 en el asa L1. La apertura requirió una separación aproximada de 7 Å para evitar que las cadenas laterales de la Asn37, o residuos aledaños como Phe38 o Asp85, bloquearan la entrada a la cavidad y permitieran el paso de moléculas de agua.

La apertura del poro estuvo correlacionada con movimientos en los ángulos diedros χ_1 de Y84 y ϕ de D85. De acuerdo con la Figura 25, los conformeros abiertos se establecieron cuando el ángulo χ_1 de Y84 se encontró alrededor de los 60° y -60° , en contraste a los 180° y -180° que permanecieron durante la mayor parte de la simulación. En el caso del ángulo ϕ de D85, el ángulo alrededor de 60° favoreció a los conformeros cerrados, y -60° a los abiertos. Estos estados abiertos minoritarios redujeron su ocurrencia en los complejos, donde no se observó el cambio en el ángulo ϕ , y de manera muy escasa con Y84. De acuerdo con la frecuencia de intercambio de agua mostrada por los conteos de agua internalizadas, este par de ángulos no comprendieron la totalidad de estructuras con poros transitorios. Sin embargo, las claras diferencias entre la apoproteína y el complejo son indicios de comportamientos distintos en la región de la boca de mMUP-1 que influyen en el intercambio de moléculas de agua de alta energía entre la cavidad y el seno acuoso.

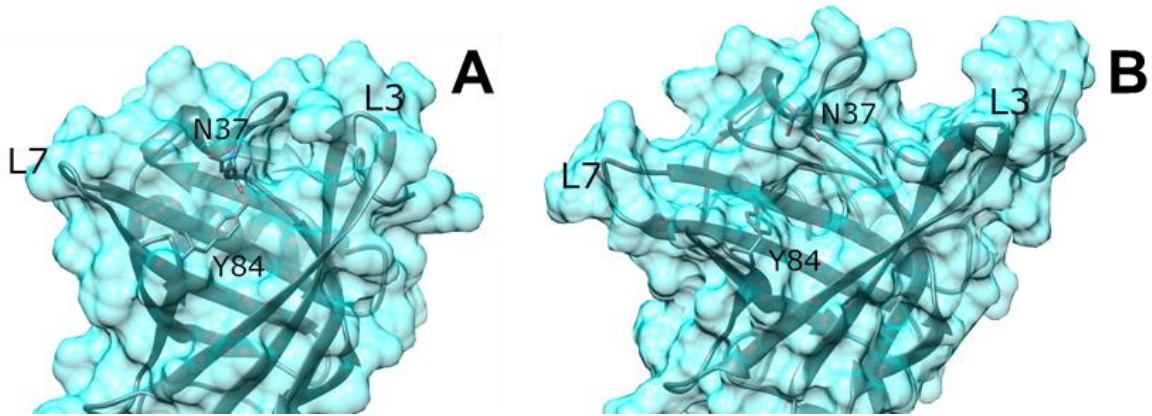


Figura 24: **A)** Poro cerrado y **B)** Poro abierto de mMUP-1 debido a la ruptura del puente de hidrógeno entre el hidroxilo de Y84 y el carbonilo de cadena principal de N37.

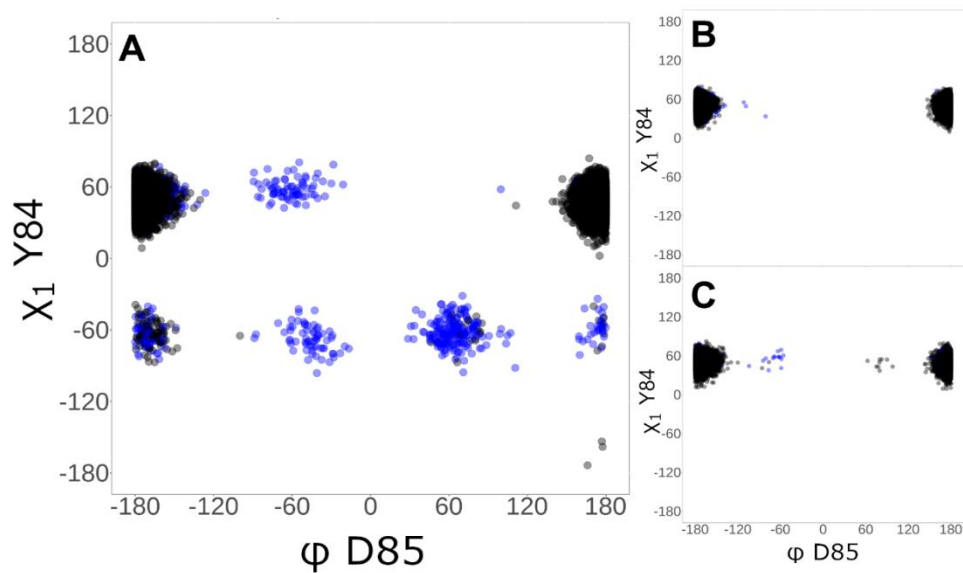


Figura 25: Distribución de los ángulos χ_1 de Y84 y ϕ de D85, indicando conformeros con separación entre Y84 y N37 menor (negro) o mayor (azul) a 7 Å. **A)** mMUP-1^{apo}, **B)** mMUP-1^{pentanol}. **C)** mMUP-1^{nonanol}.

Análisis de la solvatación y formación de poros entre las distintas lipocalinas

El presente estudio representa la primera caracterización detallada del estado de hidratación residual de la cavidad de unión de mMUP-1, y la influencia que tiene sobre ésta la unión de ligandos de diferente tamaño. Un estudio semejante, aunque con menor detalle, fue realizado recientemente con bOBP (Gómez-Velasco *et al.*, 2020). Los dos modelos proteicos presentan en su estructura cristalográfica la cavidad apolar aislada del solvente. A pesar de ello, en ambos se observa un intercambio dinámico de moléculas de agua con el seno acuoso a lo largo de las simulaciones. mMUP-1 presenta distribuciones con un número menor de moléculas de agua, implicando que posee una hidratación residual disminuida comparada con bOBP (Tabla 3).

Tabla 3: Tabla comparativa de la solvatación interna y el número de poros encontrados en las apoproteínas de bOBP y mMUP1.-1

Lipocalina	N_w	N_{HB}	N_{poros}	Referencia
bOBP_{121G+}	7.6 ± 2.9	2.5 ± 0.9	3	Gómez-Velasco <i>et al.</i> (2020)
mMUP-1	4.8 ± 2.0	2.0 ± 0.7	1	Este trabajo

N_w Promedio de aguas en la cavidad. N_{HB} Promedio de puentes de hidrógeno por molécula de agua en la cavidad N_{poros} Número de poros transitorios identificados.

En ambas proteínas, las moléculas de agua internas presentan un número de puentes de hidrógeno subóptimo, y su energía potencial es significativamente menos favorable que las del seno acuoso, por lo que se pueden considerar como moléculas de agua de alta energía. En bOBP, el tamaño de la cadena alifática influye en la cantidad de moléculas de agua desplazadas. Mientras que el hexenol desplaza ~5 moléculas de agua, el octenol desplaza ~7. En cambio, este comportamiento no está presente en la unión de pentanol y nonanol para mMUP-1, donde en promedio ambos ligandos desplazaron dos moléculas de agua de la cavidad. Por otro lado, los datos sugieren que las interacciones intermoleculares son distintas, lo que puede tener impactos diferenciales en la termodinámica de unión. El tamaño del nonanol le permite generar más contactos soluto-soluto con la proteína, además de que el complejo con nonanol relaja la estructura de las asas L4 y L7 de la proteína, incrementando su entropía conformacional.

La caracterización computacional permitió identificar potenciales confórmeros abiertos de las proteínas, como ya ha sido reportado para bOBP. Comparando mMUP-1 con bOBP, se distinguen 2 poros en una zona similar de ambas proteínas. Las simulaciones presentadas en este trabajo exponen la importancia de la Tyr ubicada en L5 al formar y romper un puente de hidrógeno con la cadena principal de L1 que regula la entrada a la cavidad. Por su parte, en bOBP estas asas permanecen inamovibles, y esa entrada se reemplaza con la ruptura de contacto entre los residuos F36 y N105. En ambas proteínas, se encontró que este poro es la principal vía de intercambio de moléculas de agua cuando la cavidad no está ocupada por un ligando. La formación de complejo atenúa la actividad del poro.

A pesar de compartir solo el 27% de identidad de secuencia, las dinámicas demostraron que bOBP y mMUP-1 comparten al menos un poro involucrando la hebra β E en ambas proteínas. La apertura transitoria de estos poros permite la entrada de agua a la cavidad y la capacidad de aislarla de manera efectiva del seno acuoso para preservar moléculas de agua de alta energía previo a la formación del complejo con el ligando.

Conclusiones

Se ha reportado que las lipocalinas mMUP-1 y bOBP presentan efecto hidrofóbico no clásico al unir ligandos apolares y al analizar una serie de ligandos congénéricos la firma termodinámica específica también es dirigida entálpicamente (Malham *et al*, 2005; Gómez-Velasco *et al.*, 2020). Sin embargo, presentan sutiles diferencias en esta última. La ganancia entálpica y la penalización entrópica para mMUP-1 es más sutil, pero no hay cambios significativos en el incremento de la afinidad comparado con bOBP. En cambio, la disminución en la capacidad calorífica es más pronunciada en mMUP-1.

Para bOBP se ha propuesto que la ganancia entálpica que presentan ligandos con un mayor número de grupos metileno es ocasionada por la diferencia en el número de moléculas de agua de alta energía que son liberadas desde la cavidad. Con el fin de corroborar si esta estrategia también era aplicada para la proteína mMUP-1, se evaluó la apoproteína y los complejos formados con 1-pentanol y 1-nonanol como ligandos. Dentro de la cavidad existen dos sitios de hidratación definidos coexistiendo con moléculas de agua de alta energía deslocalizadas que se mueven libremente, similares a las de bOBP que no presenta sitios de hidratación definidos. La tendencia de las moléculas de agua de ocupar los sitios de hidratación se mantuvo en los complejos y se determinó la liberación de 2 moléculas de agua en promedio desde la cavidad para ambos ligandos. Esta observación difiere del comportamiento de bOBP que libera moléculas de agua en función del tamaño del ligando. Las simulaciones indican que no existen diferencias en el aporte de desolvatación de la cavidad para mMUP-1 usando 1-pentanol o 1-nonanol como ligandos. Por otra parte, el incremento en las interacciones soluto-soluto y el costo de desolvatación del ligando, estarían originando los cambios modestos en entropía y entalpía del sistema y el pronunciado descenso en la capacidad calorífica.

Perspectivas

Respecto a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se proponen las siguientes perspectivas:

Se optó por realizar simulaciones de dinámicas moleculares 3 veces más largas que las reportadas actualmente para mMUP-1, sin embargo, no se evaluaron réplicas. A pesar de que las funciones de autocorrelación dan indicios de que las dinámicas convergen, sería beneficiosa la evaluación del espacio conformacional explorado por la proteína realizando replicas y determinando si 1 μ s es adecuado para la convergencia del sistema.

La selección de 1-pentanol y 1-nonanol, de la serie de n-alcoholes disponible, se hizo con la finalidad de observar los cambios más drásticos posibles entre los ligandos. Sin embargo, alcoholes intermedios como el 1-hexanol y el 1-heptanol poseen aguas cristalográficas localizadas fuera de las zonas principales de hidratación de mMUP-1, evaluar los patrones de hidratación de esos sistemas permitirá confirmar o descartar la presencia de aguas estabilizadas específicamente por el ligando.

Finalmente, realizar la caracterización de hidratación a la lipocalina rOBP3, en la cual su firma termodinámica indica que la formación del complejo es entálpicamente dirigida, pero la evaluación de la serie de γ -lactonas exhibe efecto hidrofóbico clásico específico. La comparación de rOBP3 con bOBP y mMUP-1 ayudará a discernir de manera más clara el papel de las moléculas de agua de alta energía durante el reconocimiento molecular de proteínas que presentan efecto hidrofóbico no clásico.

Referencias

- Alvarez-Garcia, D., & Barril, X. (2014). Molecular simulations with solvent competition quantify water displaceability and provide accurate interaction maps of protein binding sites. *Journal of Medicinal Chemistry*, *57*(20), 8530–8539. <https://doi.org/10.1021/jm5010418>
- Bakirci, H., Koner, A. L., & Nau, W. M. (2005). Binding of inorganic cations by p-sulfonatocalix[4]arene monitored through competitive fluorophore displacement in aqueous solution. *Chemical Communications*, *43*, 5411–5413. <https://doi.org/10.1039/b510319c>
- Bakulin, A. A., Liang, C., Jansen, T. L. A. C., Wiersma, D. A., Bakker, H. J., & Shenichnikov, M. S. P. (2009). Hydrophobic solvation: A 2D IR spectroscopic inquest. *Accounts of Chemical Research*, *42*(9), 1229–1238. <https://doi.org/10.1021/ar9000247>
- Barelrier, S., Boyce, S. E., Fish, I., Fischer, M., Goodin, D. B., & Shoichet, B. K. (2013). Roles for Ordered and Bulk Solvent in Ligand Recognition and Docking in Two Related Cavities. *PLoS ONE*, *8*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069153>
- Barratt, E., Bingham, R. J., Warner, D. J., Laughton, C. A., Phillips, S. E. V., & Homans, S. W. (2005). Van der Waals interactions dominate ligand-protein association in a protein binding site occluded from solvent water. *Journal of the American Chemical Society*, *127*(33), 11827–11834. <https://doi.org/10.1021/ja0527525>
- Bellissent-Funel, M. C., Hassanali, A., Havenith, M., Henchman, R., Pohl, P., Sterpone, F., Van Der Spoel, D., Xu, Y., & Garcia, A. E. (2016). Water Determines the Structure and Dynamics of Proteins. *Chemical Reviews*, *116*, 7673–7697. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00664>
- Bianchet, M., Bains, G., Pelosi, P., Pevsner, J., Snyder, S. H., Monaco, H., & Amzel, M. (1996). The three-dimensional structure of bovine odorant binding protein and its mechanism of odor recognition. *Nature Structural Biology*, *3*(11), 934–939.
- Biedermann, F., Nau, W. M., & Schneider, H. (2014). The Hydrophobic Effect Revisited — Studies with Supramolecular Complexes Imply High-Energy Water as a Noncovalent Driving Force. *Angewandte Chemie International Edition*, *53*, 2–16. <https://doi.org/10.1002/anie.201310958>
- Biedermann, F., Uzunova, V. D., Scherman, O. A., Nau, W. M., & Simone, A. De. (2012). Release of High-Energy Water as an Essential Driving Force for the High-Affinity Binding of Cucurbit[*n*]urils. *Journal of the American Chemical Society*, *134*, 15318–15323.
- Biela, A., Nasief, N. N., Betz, M., Heine, A., Hangauer, D., & Klebe, G. (2013). Dissecting the hydrophobic effect on the molecular level: The role of water, enthalpy, and entropy in ligand binding to thermolysin. *Angewandte Chemie - International Edition*, *52*(6), 1822–1828. <https://doi.org/10.1002/anie.201208561>
- Bronowska, A. (2011). Thermodynamics of Ligand-Protein Interactions: Implications for Molecular Design. In *Thermodynamics - Interaction Studies - Solids, Liquids and Gases* (pp. 1–49). <https://doi.org/10.5772/19447>
- Buchanan, P., Aldiwan, N., Soper, A. K., Creek, J. L., & Koh, C. A. (2005). Decreased structure on dissolving methane in water. *Chemical Physics Letters*, *415*(1–3), 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2005.08.064>

- Burley, S. K., & Petsko, G. A. (1988). Weakly Polar Interactions in Proteins. *Advances in Protein Chemistry*, 39, 125–189.
- Camilloni, C., Bonetti, D., Morrone, A., Giri, R., Dobson, C. M., Brunori, M., Gianni, S., & Vendruscolo, M. (2016). Towards a structural biology of the hydrophobic effect in protein folding. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep28285>
- Carey, C., Cheng, Y., & Rossky, P. J. (2000). Hydration structure of the α -chymotrypsin substrate binding pocket: the impact of constrained geometry. *Chemical Physics*, 258, 415–425.
- Castronuovo, G., & Niccoli, M. (2011). Solvent effects on the complexation of 1-alkanols by parent and modified cyclodextrins. Calorimetric studies at 298 K. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 103(2), 641–646. <https://doi.org/10.1007/s10973-010-0965-8>
- Chandler, D. (2005). Interfaces and the driving force of hydrophobic assembly. *Nature*, 437(7059), 640–647. <https://doi.org/10.1038/nature04162>
- Chen, X., Weber, I., & Harrison, R. W. (2008). Hydration water and bulk water in proteins have distinct properties in radial distributions calculated from 105 atomic resolution crystal structures. *Journal of Physical Chemistry B*, 112(38). <https://doi.org/10.1021/jp802795a>.Hydration
- Chen, W., Chang, C. E., & Gilson, M. K. (2004). Calculation of cyclodextrin binding affinities: Energy, entropy, and implications for drug design. *Biophysical Journal*, 87(5), 3035–3049. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.049494>
- Chodera, J. D., & Mobley, D. L. (2013). Entropy-enthalpy compensation: Role and ramifications in biomolecular ligand recognition and design. *Annual Review of Biophysics*, 42(1), 121–142. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-083012-130318>
- Dartt, D. A. (2011). Tear lipocalin: Structure and function. *Ocular Surface*, 9(3), 126–138. [https://doi.org/10.1016/S1542-0124\(11\)70022-2](https://doi.org/10.1016/S1542-0124(11)70022-2)
- Englert, L., Biela, A., Zayed, M., Heine, A., Hangauer, D., & Klebe, G. (2010). Displacement of disordered water molecules from hydrophobic pocket creates enthalpic signature: Binding of phosphonamidate to the S1'-pocket of thermolysin. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1800(11), 1192–1202. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2010.06.009>
- Fischer, S., & Verma, C. S. (1999). Binding of buried structural water increases the flexibility of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(17), 9613–9615. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.17.9613>
- Flower, D. R. (1996). The lipocalin protein family : structure and function. *Biochemical Journal*, 318, 1–14.
- Flower, D. R. (1995). Multiple Molecular Recognition Properties of the Lipocalin Protein Family. *Journal of Molecular Recognition*, 8, 185–195.
- Flower, D. R., North, A. C. T., & Sansom, C. E. (2000). The lipocalin protein family: Structural and sequence overview. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1482(1–2), 9–24. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(00\)00148-5](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(00)00148-5)
- Frank, H. S., & Evans, M. W. (1945). 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. *The Journal of Chemical Physics*, 13(11), 507–532. <https://doi.org/10.1063/1.1723985>

- Fucke, K., Anderson, K. M., Filby, M. H., Henry, M., Wright, J., Mason, S. A., Gutmann, M. J., Barbour, L. J., Oliver, C., Coleman, A. W., Atwood, J. L., Howard, J. A. K., & Steed, J. W. (2011). The structure of water in p-sulfonatocalix[4]arene. *Chemistry - A European Journal*, 17(37), 10259–10271. <https://doi.org/10.1002/chem.201101748>
- Galamba, N. (2013). Water's structure around hydrophobic solutes and the iceberg model. *Journal of Physical Chemistry B*, 117(7), 2153–2159. <https://doi.org/10.1021/jp310649n>
- Gallo, P. N., Iovine, J. C., & Nucci, N. V. (2018). Toward comprehensive measurement of protein hydration dynamics: Facilitation of NMR-based methods by reverse micelle encapsulation. *Methods*, 148, 146–153. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2018.07.008>
- Gao, F., Endo, H., & Yamamoto, M. (1989). Length heterogeneity in rat salivary gland a24 globulin mRNAs: multiple splice-acceptors and polyadenylation sites. *Nucleic Acids Research*, 17(12), 4629–4636.
- Gómez-Baena, G., Armstrong, S. D., Halstead, J. O., Prescott, M., Roberts, S. A., McLean, L., Mudge, J. M., Hurst, J. L., & Beynon, R. J. (2019). Molecular complexity of the major urinary protein system of the Norway rat, *Rattus norvegicus*. *Scientific Reports*, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46950-x>
- Gómez-Velasco, H., Rojo-Domínguez, A., & García-Hernández, E. (2020). Enthalpically-driven ligand recognition and cavity solvation of bovine odorant binding protein. *Biophysical Chemistry*, 257(December 2019), 106315. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2019.106315>
- Halle, B., & Davidovic, M. (2003). Biomolecular hydration: From water dynamics to hydrodynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(21), 12135–12140. <https://doi.org/10.1073/pnas.2033320100>
- He, X., Liu, S., Lee, T. S., Ji, B., Man, V. H., York, D. M., & Wang, J. (2020). Fast, Accurate, and Reliable Protocols for Routine Calculations of Protein-Ligand Binding Affinities in Drug Design Projects Using AMBER GPU-TI with ff14SB/GAFF. *ACS Omega*, 5(9), 4611–4619. <https://doi.org/10.1021/acso-mega.9b04233>
- Homans, S. W. (2007). Water, water everywhere - except where it matters? In *Drug Discovery Today* (Vol. 12, Issues 13–14, pp. 534–539). Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.05.004>
- Huai, Z., Shen, Z., & Sun, Z. (2021). Binding Thermodynamics and Interaction Patterns of Inhibitor-Major Urinary Protein-I Binding from Extensive Free-Energy Calculations: Benchmarking AMBER Force Fields. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 61(1), 284–297. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/acs.jcim.0c01217>
- Hubbard, R. E., & Kamran Haider, M. (2010). Hydrogen Bonds in Proteins: Role and Strength. *Encyclopedia of Life Sciences*, February. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0003011.pub2>
- Jeffrey, G. A. (1969). Water Structure in Organic Hydrates. *Accounts of Chemical Research*, 2(11), 344–352.
- Kairys, V., Baranauskiene, L., Kazlauskiene, M., Matulis, D., & Kazlauskas, E. (2019). Binding affinity in drug design: experimental and computational techniques. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 14(8), 755–768. <https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1623202>

- Kauzmann, W. (1959). Some Factors in the Interpretation of Protein Denaturation. *Advances in Protein Chemistry*, 14, 1–63. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60608-7](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60608-7)
- Khatri, K., Modi, P., Sharma, S., & Deep, S. (2020). Thermodynamics of Protein-Ligand Binding. In D. B. Singh & T. Tripathi (Eds.), *Frontiers in Protein Structure, Function, and Dynamics* (pp. 145–185). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-5530-5>
- Ko, Y. H., Kim, Y., Kim, H., & Kim, K. (2011). U-shaped conformation of alkyl chains bound to a synthetic receptor cucurbit[8]uril. *Chemistry - An Asian Journal*, 6(2), 652–657. <https://doi.org/10.1002/asia.201000665>
- Kronberg, B. (2016). The hydrophobic effect. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 22, 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2016.02.001>
- Kuser, P. R., Franzoni, L., Ferrari, E., Spisni, A., & Polikarpov, I. (2001). The X-ray structure of a recombinant major urinary protein at 1.75 Å resolution. A comparative study of X-ray and NMR-derived structures. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 57(12), 1863–1869. <https://doi.org/10.1107/S090744490101825X>
- Lakshmi, B., Mishra, M., Srinivasan, N., & Archunan, G. (2015). Structure-based phylogenetic analysis of the Lipocalin superfamily. *PLoS ONE*, 10(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135507>
- Liu, P., Harder, E., & Berne, B. J. (2004). On the calculation of diffusion coefficients in confined fluids and interfaces with an application to the liquid-vapor interface of water. *Journal of Physical Chemistry B*, 108(21), 6595–6602. <https://doi.org/10.1021/jp0375057>
- Löbel, D., Strotmann, J., Jacob, M., & Breer, H. (2001). Identification of a third rat odorant-binding protein (OBP3). *Chemical Senses*, 26(6), 673–680. <https://doi.org/10.1093/chemse/26.6.673>
- Loch, J. I., Bonarek, P., Polit, A., Świątek, S., Dziejzicka-Wasylewska, M., & Lewiński, K. (2013). The differences in binding 12-carbon aliphatic ligands by bovine β -lactoglobulin isoform A and B studied by isothermal titration calorimetry and X-ray crystallography. *Journal of Molecular Recognition*, 26(8), 357–367. <https://doi.org/10.1002/jmr.2280>
- Lockett, M. R., Lange, H., Breiten, B., Heroux, A., Sherman, W., Rappoport, D., Yau, P. O., Snyder, P. W., & Whitesides, G. M. (2013). The binding of benzoarylsulfonamide ligands to human carbonic anhydrase is insensitive to formal fluorination of the ligand. *Angewandte Chemie - International Edition*, 52(30), 7714–7717. <https://doi.org/10.1002/anie.201301813>
- Lum, K., Chandler, D., & Weeks, J. D. (1999). Hydrophobicity at Small and Large Length Scales. *Journal of Physical Chemistry B*, 103(22), 4570–4577. <https://doi.org/10.1177/074193258901000304>
- Macek, P., Novák, P., Zidek, L., & Sklenár, V. (2007). Backbone Motions of Free and Pheromone-Bound Major Urinary Protein I Studied by Molecular Dynamic Simulation. *Journal of Physical Chemistry B*, 111(20), 5731–5739. <https://doi.org/10.1109/5992.743625>
- MacRaild, C. A., Daranas, A. H., Bronowska, A., & Homans, S. W. (2007). Global Changes in Local Protein Dynamics Reduce the Entropic Cost of Carbohydrate Binding in the Arabinose-binding Protein. *Journal of Molecular Biology*, 368(3), 822–832. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.02.055>
- Malham, R., Johnstone, S., Bingham, R. J., Barratt, E., Phillips, S. E. V., Laughton, C. A., & Homans, S. W. (2005). Strong solute-solute dispersive interactions in a protein-ligand complex. *Journal of the American Chemical Society*, 127(48), 17061–17067. <https://doi.org/10.1021/ja055454g>

- Maier, J. A., Martinez, C., Kasavajhala, K., Wickstrom, L., Hauser, K., Simmerling, C., & Hauser, K. E. (2015). ff14SB: Improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 11(8), 3696–3713. <http://pubs.acs.org>
- Mattea, C., Qvist, J., & Halle, B. (2008). Dynamics at the protein-water interface from 17O spin relaxation in deeply supercooled solutions. *Biophysical Journal*, 95(6), 2951–2963. <https://doi.org/10.1529/biophysj.108.135194>
- Meyer, E. A., Castellano, R. K., & Diederich, F. (2003). Interactions with aromatic rings in chemical and biological recognition. In *Angewandte Chemie - International Edition* (Vol. 42, Issue 11). <https://doi.org/10.1002/anie.200390319>
- Mucignat-Caretta, C., & Caretta, A. (2014). Message in a bottle: Major urinary proteins and their multiple roles in mouse intraspecific chemical communication. *Animal Behaviour*, 97, 255–263. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2014.08.006>
- Nakasako, M., Finney, J. L., Rand, P., Engberts, J. B. F. N., McKendry, R., & Zaccai, G. (2004). Water-protein interactions from high-resolution protein crystallography. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 359, 1191–1206. <https://doi.org/10.1098/rstb.2004.1498>
- Newcomer, M. E., & Ong, D. E. (2000). Plasma retinol binding protein: Structure and function of the prototypic lipocalin. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1482(1–2), 57–64. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(00\)00150-3](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(00)00150-3)
- Nguyen, C. N., Kurtzman Young, T., & Gilson, M. K. (2012). Grid inhomogeneous solvation theory: Hydration structure and thermodynamics of the miniature receptor cucurbit[7]uril. *Journal of Chemical Physics*, 137(4), 973–980. <https://doi.org/10.1063/1.4733951>
- Paschek, D., Day, R., & Garcia, A. E. (2011). Influence of water-protein hydrogen bonding on the stability of Trp-cage miniprotein. A comparison between the TIP3P and TIP4P-Ew water models. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 13(44), 19840–19847. <https://doi.org/10.1039/c1cp22110h>
- Patel, A. J., Varilly, P., & Chandler, D. (2010). Fluctuations of water near extended hydrophobic and hydrophilic surfaces. *Journal of Physical Chemistry B*, 114(4), 1632–1637. <https://doi.org/10.1021/jp909048f>.Fluctuations
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
- Pevsner, J., & Snyder, S. H. (1990). Odorant-binding protein: odorant transport function in the vertebrate nasal epithelium Present address : Department of Biological Sciences , Stanford University , cDNA cloning and sequence analysis derived from rat olfactory epithelium (Pevsner et al .. *Chemical Senses*, 15(2), 217–222.
- Portman, K. L., Long, J., Carr, S., Briand, L., Winzor, D. J., Searle, M. S., & Scott, D. J. (2014). Enthalpy/entropy compensation effects from cavity desolvation underpin broad ligand binding selectivity for rat odorant binding protein 3. *Biochemistry*, 53(14), 2371–2379. <https://doi.org/10.1021/bi5002344>
- Ramoni, R., Vincent, F., Ashcroft, A. E., Accornero, P., Grolli, S., Valencia, C., Tegoni, M., & Cambillau, C. (2002). Control of domain swapping in bovine odorant-binding protein. *Biochemical Journal*, 365(3), 739–748. <https://doi.org/10.1042/BJ20011631>

- Ramoni, R., Vincent, F., Grolli, S., Conti, V., Malosse, C., Boyer, F. D., Meillour, P. N. Le, Spinelli, S., Cambillau, C., & Tegoni, M. (2001). The Insect Attractant 1-Octen-3-ol is the Natural Ligand of Bovine Odorant-binding Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 276(10), 7150–7155. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010368200>
- Rekharsky, M. V., & Inoue, Y. (1998). Complexation Thermodynamics of Cyclodextrins. *Chemical Reviews*, 98(5), 1875–1917.
- Rekharsky, M. V., Mori, T., Yang, C., Ko, Y. H., Selvapalam, N., Kim, H., Sobransingh, D., Kaifer, A. E., Liu, S., Isaacs, L., Chen, W., Moghaddam, S., Gilson, M. K., Kim, K., & Inoue, Y. (2007). A synthetic host-guest system achieves avidin-biotin affinity by overcoming enthalpy – entropy compensation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(52), 20737–20742.
- Ricatti, J., Acquasaliente, L., Ribaudou, G., De Filippis, V., Bellini, M., Llovera, R. E., Barollo, S., Pezzani, R., Zagotto, G., Persaud, K. C., & Mucignat-Caretta, C. (2019). Effects of point mutations in the binding pocket of the mouse major urinary protein MUP20 on ligand affinity and specificity. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36391-3>
- Roe, D. R., & Cheatham, T. E. (2013). PTRAJ and CPPTRAJ: Software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 9(7), 3084–3095. <https://doi.org/10.1021/ct400341p>
- Ross, P. D., & Subramanian, S. (1981). Thermodynamics of Protein Association Reactions: Forces Contributing to Stability. *Biochemistry*, 20(11), 3096–3102. <https://doi.org/10.1021/bi00514a017>
- Rovoli, M., Thireou, T., Choiset, Y., Haertlé, T., Sawyer, L., Eliopoulos, E., & Kontopidis, G. (2018). Thermodynamic, crystallographic and computational studies of non-mammalian fatty acid binding to bovine β -Lactoglobulin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 118(2017), 296–303. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.226>
- Roy, J., & Laughton, C. A. (2010). Long-timescale molecular-dynamics simulations of the major urinary protein provide atomistic interpretations of the unusual thermodynamics of ligand binding. *Biophysical Journal*, 99(1), 218–226. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.03.055>
- Seelig, J., & Ganz, P. (1991). Nonclassical Hydrophobic Effect in Membrane Binding Equilibria. *Biochemistry*, 30(38), 9354–9359. <https://doi.org/10.1021/bi00102a031>
- Setny, P., Baron, R., & McCammon, J. A. (2010). How can hydrophobic association be enthalpy driven? *Journal of Chemical Theory and Computation*, 6(9), 2866–2871. <https://doi.org/10.1021/ct1003077>
- Sharma, S., & DeBenedetti, P. G. (2012). Evaporation rate of water in hydrophobic confinement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(12), 4365–4370. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116167109>
- Sharrow, S. D., Novotny, M. V., & Stone, M. J. (2003). Thermodynamic Analysis of Binding between Mouse Major Urinary Protein-I and the Pheromone 2-sec-Butyl-4,5-dihydrothiazole. *Biochemistry*, 42, 6302–6309.
- Shimokhina, N., Bronowska, A., & Homans, S. W. (2006). Contribution of ligand desolvation to binding thermodynamics in a ligand-protein interaction. *Angewandte Chemie - International Edition*, 45(38), 6374–6376. <https://doi.org/10.1002/anie.200602227>

- Silverstein, K. A. T., Haymet, A. D. J., & Dill, K. A. (1998). A simple model of water and the hydrophobic effect. *Journal of the American Chemical Society*, *120*(13), 3166–3175. <https://doi.org/10.1021/ja973029k>
- Smithrud, D. B., & Diederich, F. (1990). Strength of Molecular Complexation of Apolar Solutes in Water and in Organic Solvents is Predictable by Linear Free Energy Relationships: A General Model for Solvation Effects on Apolar Binding. *Journal of the American Chemical Society*, *112*(1), 339–343. <https://doi.org/10.1021/ja00157a052>
- Smithrud, D. B., Wyman, T. B., & Diederich, F. (1991). Enthalpically Driven Cyclophane-Arene Inclusion Complexation: Solvent-Dependent Calorimetric Studies. *Journal of the American Chemical Society*, *113*(14), 5420–5426. <https://doi.org/10.1021/ja00014a038>
- Snyder, P. W., Lockett, M. R., Moustakas, D. T., & Whitesides, G. M. (2013). Is it the shape of the cavity, or the shape of the water in the cavity? *European Physical Journal: Special Topics*, *223*(5), 853–891. <https://doi.org/10.1140/epjst/e2013-01818-y>
- Snyder, P. W., Mecinović, J., Moustakas, D. T., Thomas, S. W., Harder, M., Mack, E. T., Lockett, M. R., Héroux, A., Sherman, W., & Whitesides, G. M. (2011). Mechanism of the hydrophobic effect in the biomolecular recognition of arylsulfonamides by carbonic anhydrase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(44), 17889–17894. <https://doi.org/10.1073/pnas.1114107108>
- Southall, N. T., Dill, K. A., & Haymet, A. D. J. (2002). A view of the hydrophobic effect. *Journal of Physical Chemistry B*, *106*(3), 521–533. <https://doi.org/10.1021/jp015514e>
- Syme, N. R., Dennis, C., Phillips, S. E. V., & Homans, S. W. (2007). Origin of heat capacity changes in a “nonclassical” hydrophobic interaction. *ChemBioChem*, *8*(13), 1509–1511. <https://doi.org/10.1002/cbic.200700281>
- Tanford, C. (1980). *The hydrophobic effect. Formation of micelles and biological membranes* (Segunda edición). John Wiley & Sons.
- Tao, Y., Gu, X., Deng, L., Qin, Y., Xue, H., & Kong, Y. (2015). Chiral recognition of D-tryptophan by confining high-energy water molecules inside the cavity of copper-modified β -cyclodextrin. *Journal of Physical Chemistry C*, *119*(15), 8183–8190. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b00927>
- Timm, D. E., Baker, L. J., Mueller, H., Zidek, L., & Novotny, M. V. (2001). Structural basis of pheromone binding to mouse major urinary protein (MUP-I). *Protein Science*, *10*(5), 997–1004. <https://doi.org/10.1110/ps.52201>
- Wang, J., Wolf, R. M., Caldwell, J. W., Kollman, P. A., & Case, D. A. (2004). Development and Testing of a General Amber Force Field. *Journal of Computational Chemistry*, *25*(9), 1157–1174.
- Weimann, D. P., & Schalley, C. A. (2008). Host-guest chemistry of self-assembling supramolecular capsules in the gas phase. *Supramolecular Chemistry*, *20*(1–2), 117–128. <https://doi.org/10.1080/10610270701771800>
- Yan, L., Borregaard, N., Kjeldsen, L., & Moses, M. A. (2001). The high molecular weight urinary matrix metalloproteinase (MMP) activity is a complex of gelatinase B/MMP-9 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): Modulation of MMP-9 activity by NGAL. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(40), 37258–37265. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106089200>

- Young, T., Hua, L., Huang, X., Abel, R., Friesner, R., & Berne, B. J. (2010). Dewetting transitions in protein cavities. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 78(8), 1856–1869. <https://doi.org/10.1002/prot.22699>
- Zhang, H., Yin, C., Jiang, Y., & Van Der Spoel, D. (2018). Force Field Benchmark of Amino Acids: I. Hydration and Diffusion in Different Water Models. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 58(5), 1037–1052. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.8b00026>
- Zhou, H. X., & Pang, X. (2018). Electrostatic Interactions in Protein Structure, Folding, Binding, and Condensation. *Chemical Reviews*, 118(4), 1691–1741. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00305>