



**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS MÉDICAS DE LA HABANA
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS Y PRECLÍNICAS “VICTORIA DE
GIRÓN”. DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**UNIVERSIDAD DE LA HABANA
FACULTAD DE QUÍMICA. DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS. DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA
APLICADA**

Modelación Molecular de Rodopsinas Humanas Mutantes asociadas a *Retinosis Pigmentaria*.

***Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias
Médicas***

Autor: MSc. Erix Wiliam Hernández Rodríguez.

La Habana y Madrid

2013



**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS MÉDICAS DE LA HABANA
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS Y PRECLÍNICAS “VICTORIA DE
GIRÓN”. DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**UNIVERSIDAD DE LA HABANA
FACULTAD DE QUÍMICA. DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS. DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA
APLICADA**

Modelación Molecular de Rodopsinas Humanas Mutantes asociadas a *Retinosis Pigmentaria*.

***Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias
Médicas***

Autor: MSc. Erix Wiliam Hernández Rodríguez.

**Directores: Prof. DrCs. Luis Alberto Montero Cabrera.
Cat. PhD. José Manuel García de La Vega.**

**Asesores: DrC. Ana Lilian Montero Alejo.
DrC. Elsa Sánchez García.**

La Habana y Madrid

2013

AGRADECIMIENTOS

- A mis directores de tesis Luis Alberto Montero Cabrera y José Manuel García de La Vega por ser escuelas en todo momento que brindan apoyo, conocimientos, confianza, seguridad y entusiasmo para que se logre la necesaria independencia durante la investigación.
- A Ana Lilian Montero Alejo por su asesoría decisiva con conocimientos, modestia, sinceridad y espíritu colaborativo, lo cual fue muy importante para realizar el trabajo.
- A Elsa Sánchez García por su supervisión y apoyo crucial durante las etapas del trabajo.
- A Rachel Crespo Otero y Reynier Suardiaz del Río por sus excelentes sugerencias.
- Al profesor Rafael López por poner a mi disposición conocimientos, tiempo y creatividad, siendo para mí también en poco tiempo un ejemplo de científico a seguir.
- Al profesor Walter Thiel por el apoyo desde el punto de vista metodológico y en recursos para la investigación.
- A Sandra Blois por facilitarme el tiempo necesario para una parte del trabajo durante su supervisión.
- A Elke Gnielka por su amistad y ayuda para concretar este trabajo.
- A los profesores José Carlos García Piñeiro y Orfilio Peláez Molina, también a sus discípulos del Centro Internacional de Retinosis Pigmentaria de Cuba, por sus sapiencias y entusiasmos que despertaron mi interés para estudiar las distrofias retinianas, lo cual me llevó a visualizar las preguntas fundamentales de esta investigación.
- A todos los colegas estudiantes y profesores del Laboratorio de Química Computacional y Teórica de la Facultad de Química de la Universidad de La Habana y del Departamento de Química Física Aplicada de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid por el ambiente creativo y solidario en beneficio del trabajo; así como a colegas del Departamento de Bioquímica del Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas “Victoria de Girón” por el apoyo incondicional en su debido momento.
- A Max-Planck-Institut für Kohlenforschung, Charité University y Agencia Española de Cooperación Internacional (AECID) por las facilidades y recursos esenciales brindados.

Se dedica:

a mi hijo y esposa, de quienes emana la fuerza mayor;

a mis padres y abuelos, de quienes recibí la primera y tan valiosa educación;

a mi hermana, quien siempre me apoya; y

a mis amigos, de quienes aprendo.

“No desprecies a nadie; un átomo hace sombra”.

Pitágoras de Samos.

GLOSARIO DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ALE	Alternancia de longitud de enlace de la cadena poliénica del retinal
ABNR	<u>Augment Basis Newton—Raphson</u> (procedimiento de minimización de energía con incremento de base Newton—Raphson)
BH—LYP o B3LYP	Siglas provenientes de los términos <u>Becke (Becke 3)—Lee—Yang—Parr</u> , utilizadas para denominar funcionales híbridos de correlación—intercambio
BLAST	<u>Basic Local Alignment Search Tool</u> (herramienta básica de búsqueda de alineamiento local)
BS	Base de Schiff
BSD	Base de Schiff no protonada
BSP	Base de Schiff protonada
CG	<u>Conjugated Gradient</u> (algoritmo optimizador basado en el método gradiente conjugado)
CPL	Condiciones periódicas del límite usadas durante las dinámicas moleculares clásicas de las rodopsinas embebidas en membrana lipídica
DAM	<u>Deformed Atoms in Molecules</u> (método para el cálculo de las deformaciones de la densidad electrónica en una molécula)
DDE	Deformaciones de la densidad electrónica
DFT	<u>Density Functional Theory</u> (teoría de funcionales de la densidad)
DFT/MRCI	<u>Density Functional Theory/Multi—Reference Configuration Interaction</u> (método basado en la interacción de configuraciones multireferencial y la teoría de funcionales de la densidad)
DOPE	<u>Discrete Optimized Protein Energy</u> (“energía discreta” de la proteína optimizada)
E	Energía total obtenida durante dinámicas moleculares clásicas (mecánica molecular)
$EA_{m\acute{a}x}$	Energía máxima almacenada en la batorodopsina
EE	<u>Electronic Embedding</u> (esquema de inserción electrónica)
E_{ox}	Potencial de oxidación
ERO	Especies reactivas del oxígeno
EVE	Energías verticales de excitación
FTIR	<u>Fourier—transform Infrared</u> (término usado para referirse a la espectroscopia infrarroja de transformadas de Fourier)
f	Fortaleza del oscilador
HOMO	<u>Highest Occupied Molecular Orbital</u> (orbital molecular ocupado más elevado, de mayor energía)
LCAO	<u>Linear Combination of Atomic Orbitals</u> (combinación lineal de orbitales atómicos)
LUMO	<u>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</u> (orbital molecular desocupado más bajo, de menor energía)

MD	<u>Molecular Dynamics</u> (dinámica molecular clásica)
MD₁	Simulación de dinámica molecular clásica para el sistema con la rodopsina embebida en solvente explícito de agua
MD₂	Simulación de dinámica molecular clásica para el sistema con la rodopsina embebida en membrana de palmitoil—oleoil—fosfatidil—colina doblemente hidratada
MD₂^L	Simulación de dinámica molecular clásica para el sistema con la rodopsina libre de restricciones armónicas y embebida en membrana de palmitoil—oleoil—fosfatidil—colina doblemente hidratada
MD₂^R	Simulación de dinámica molecular clásica para el sistema con la rodopsina sometida a restricciones armónicas y embebida en membrana de palmitoil—oleoil—fosfatidil—colina doblemente hidratada
ME	<u>Mechanical Embedding</u> (esquema de inserción mecánica)
MM	<u>Molecular Mechanics</u> (mecánica molecular)
MRCI	<u>Multi—Reference Configuration Interaction</u> (interacción de configuraciones multireferencial)
$m = 0$	Armónico esférico (componente $d_{3z^2-r^2}$ del cuadrupolo), usado para cuantificar la
$(l = 2)$	contribución atómica a la deslocalización de la carga en la molécula retinal
N	Vector ortogonal del plano correspondiente
NBO	<u>Natural Bond Orbital</u> (orbital natural enlazante)
O₂(¹Σ_g⁺)	Segundo estado excitado del oxígeno molecular
¹O₂	Oxígeno singlete (primer estado excitado del oxígeno molecular)
o O₂[¹Δ_g]	
³O₂ o O₂	Oxígeno molecular en estado base
PDB	<u>Protein Data Bank</u> (banco de datos de proteínas)
PI_{aprox}	Potencial de ionización aproximado, se calcula como el negativo del valor de la energía del correspondiente orbital HOMO (<i>vide supra</i>)
POPC	<u>Palmitoyl—Oleoyl—Phosphatidyl—Choline</u> (palmitoil—oleoil—fosfatidil—colina)
QM	<u>Quantum Mechanics</u> (mecánica cuántica)
QM/MM	<u>Quantum Mechanics/Molecular Mechanics</u> (método híbrido mecánica cuántica/mecánica molecular)
QM—MM	<u>Quantum Mechanics—Molecular Mechanics</u> (límite entre los subsistemas QM y MM en el modelo QM/MM)
RAPG	Receptor acoplado a proteína G (transducina en retina)
pH	Negativo del valor obtenido a partir del logaritmo de base 10 con la concentración de protones de hidrógeno como argumento
pK_a	Negativo del valor obtenido a partir del logaritmo de base 10 con la constante de acidez (K _a) como argumento para el correspondiente grupo dissociable
RMSD	<u>Root—Mean—Square Deviation</u> (raíz cuadrática de la desviación, estructural, promedio), usada para evaluar similitudes entre estructuras tridimensionales

rmsd	<u>root—mean—square deviation</u> (raíz cuadrática de la desviación promedio), usada para evaluar las funciones matemáticas encontradas
RP	Retinosis pigmentaria
RPAD	Retinosis Pigmentaria con el patrón de herencia autosómico dominante
RTN349	11— <i>cis</i> —retinal
SCF	<u>Self Consistent Field</u> (campo autoconsistente)
SR	Sitio de unión del 11— <i>cis</i> —retinal dentro de la estructura tridimensional de la opsina que compone a la rodopsina
S₀	Estado singlete base
S₁	Primer estado singlete excitado o estado singlete excitado de más baja energía
S_Δ	Eficiencia para generar oxígeno singlete durante la desactivación del estado <i>T</i> ₁ por su interacción con oxígeno molecular
TDDFT	<u>Time—Dependent Density Functional Theory</u> (método basado en la teoría de funcionales de la densidad dependientes del tiempo)
TIP3P	Modelo específico para moléculas de agua descrito en campos de fuerza de mecánica molecular
TZVP o 6-31G*	Conjunto de bases utilizado en cálculos QM
T₁	Estado triplete excitado más bajo o de menor energía
UVA	Ultravioleta A
UV—Vis	Ultravioleta—visible
VTFM	<u>Variable Target Function Method</u> (método de optimización que usa la función objetivo variable de la herramienta MODELLER)
W	Moléculas de agua
WT	<u>Wild Type</u> (tipo salvaje, término usado para referirse a una variante molecular normal o no mutante)
Z	Valor de puntuación para evaluar grados de empaquetamiento de las estructuras tridimensionales
3D	Tridimensional
3D—1D	Concordancia estructural entre el nivel tridimensional y primario para evaluar la compatibilidad entre la secuencia de una proteína) y el ambiente estructural 3D
ΔE_{S₁—S₀}	Diferencia de energía entre los estados excitados <i>S</i> ₁ y <i>S</i> ₀ (EVE)
ΔE_{S₁—T₁}	Diferencia de energía entre los estados excitados <i>S</i> ₁ y <i>T</i> ₁
ΔE_{T₁—S₀} o E_{T₁}	Diferencia de energía entre los estados excitados <i>T</i> ₁ y <i>S</i> ₀ (energía del estado <i>T</i> ₁)
λ_{máx}	Longitud de onda de la radiación correspondiente al máximo de absorción espectral de una molécula
φ	Ángulo diedro
ω	Ángulo entre planos

SÍNTESIS

En este trabajo, se realiza una nueva aplicación combinada de modelación por homología, dinámica molecular clásica, teoría de funcionales de la densidad, deformaciones de la densidad electrónica y el método híbrido mecánica cuántica/mecánica molecular para evaluar propiedades geométricas, electrónicas y fotoquímicas en rodopsinas mutantes portadoras de las sustituciones M207R y S186W asociadas a Retinosis Pigmentaria (RP). Nuestros resultados para las rodopsinas bovina y humana normales, usadas como referencia, concuerdan adecuadamente con los resultados experimentales. En los mutantes, se encontró una geometría inadecuada del retinal para la reacción de fotoisomerización, una red puentes de hidrógeno del núcleo proteínico perturbada, y un corrimiento espectral hipsocrómico; esto último debido a características estructurales de la cadena del retinal, efectos del contraión e influencia del estado de protonación de la base de Schiff. Se describe, también por primera vez para el cromóforo retinal, el sistema electrónico π conjugado y sus perturbaciones en mutantes de manera explícita, una función cuadrática para la dependencia directa de las energías verticales de excitación con la alternancia de longitud de enlace, y se propone una vía para la generación fotosensibilizada de oxígeno singlete en rodopsinas que pudiera estar relacionada con la etiopatogenia de la RP y el daño fotoquímico retiniano.

ÍNDICE

	Pág.
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	8
1.1. Retinosis Pigmentaria	8
1.2. Rodopsinas normales y mutadas.....	9
1.3. Aproximaciones teóricas al espectro de absorción de la rodopsina.....	13
1.3.1. Método híbrido mecánica cuántica/mecánica molecular.....	14
1.3.2. Métodos de interacción de configuraciones multireferencial y dependientes del tiempo basados en la teoría de funcionales de la densidad	17
1.3.3. Aproximaciones a la estructura electrónica del retinal	19
1.4. Mutaciones en rodopsina y susceptibilidad al daño fotoquímico en la retina	20
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
2.1. Estructura de partida.....	24
2.2. Modelación por homología.....	25
2.3. Cálculo de los valores de pKa	26
2.4. Estimación de los estados de protonación.....	27
2.5. Optimización por mecánica molecular	29

2.6. Validación estructural.....	29
2.7. Simulaciones de dinámica molecular	30
2.7.1. Dinámica molecular de las rodopsinas en solvente explícito de agua	30
2.7.2. Dinámicas moleculares de las rodopsinas en la bicapa lipídica hidratada.....	32
2.8. Optimización por el método híbrido mecánica cuántica/mecánica molecular	34
2.9. Parámetros y campo de fuerza	35
2.10. Cálculo de propiedades geométricas del retinal	36
2.11. Cálculo de las energías verticales de excitación.....	36
2.12. Cálculo de la densidad electrónica	37
2.12.1. Descripción de orbitales frontera y de distribuciones de carga	37
2.12.2. Cálculo de las deformaciones de la densidad electrónica	37
2.13. Cálculo del potencial de ionización	39
2.14. Modelos	39
2.15. Análisis de los datos	40
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
3.1. Evaluación estructural de las rodopsinas.....	41
3.1.1. Evaluación de la calidad de las estructuras tridimensionales de las rodopsinas	41
3.1.2. Similitud entre los sitios de unión del retinal	43

3.1.3. Análisis de estabilidad	45
3.1.4. Evaluación del enlace $C_{11}=C_{12}$	51
3.1.5. Torsión y planaridad del anillo β —ionona del retinal.....	52
3.1.6. Evaluación de la alternancia de longitud de enlace	53
3.2. Análisis de las distribuciones de carga	55
3.3. Evaluación de las energías verticales de excitación	58
3.4. Análisis de la deslocalización de la carga del retinal a través de las deformaciones de la densidad electrónica. Descripción del sistema π conjugado del retinal	63
3.4.1. Análisis de los ángulos de torsión geométrica central del retinal	75
3.5. Relación entre la alternancia de longitud de enlace y la energía vertical de excitación	79
3.6. Consecuencias potenciales del exceso de energía en rodopsinas.....	81
CONCLUSIONES.....	91
RECOMENDACIONES.....	93
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94
ANEXOS.....	107

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

La Retinosis Pigmentaria (RP) es una causa frecuente de ceguera en todo el mundo y de interés especial para la comunidad científica desde hace varios años¹⁻³. Aún cuando la pérdida de la visión es progresiva para llegar finalmente a la ceguera en los pacientes que sufren RP^{2,3}, debe considerarse que incluso un impedimento visual de mediana magnitud incrementa dramáticamente el riesgo de mortalidad⁴. Aunque existen varios mecanismos etiopatogénicos propuestos, aún no se logra explicar toda la sintomatología de esta dolencia oftálmica^{2,3}. Sin embargo, la etiología genética está bien evidenciada en la mayoría de las variantes clínicas y se ha establecido que la apoptosis es el patrón de muerte celular de los fotorreceptores en la retina afectada por RP^{2,3,5-9}.

Se describe un gran número de mutaciones asociadas a esta distrofia retiniana^{2,3}; siendo aquellas que afectan el pigmento visual rodopsina las prevalecientes en la forma autosómica dominante¹⁰. No obstante, ningún mecanismo se ha descrito para explicar el vínculo directo entre los efectos moleculares de sustituciones aminoacídicas anormales en la rodopsina debido a mutaciones en su gen y la apoptosis de los fotorreceptores bastones. El conocimiento adecuado al nivel molecular sobre la etiopatogenia de una condición patológica es crucial para encontrar adecuadas estrategias que curen o mejoren la calidad de vida de los enfermos. Entonces, es necesaria la aproximación a las consecuencias moleculares de mutaciones sobre la rodopsina humana, lo cual demanda obtener y analizar la estructura tridimensional (3D) del pigmento visual, aún no resuelta experimentalmente en el caso del humano.

Existen estudios teóricos que combinan métodos de mecánica cuántica y mecánica molecular para la obtención de propiedades de proteínas, considerando el ambiente aminoacídico. Estos métodos híbridos de mecánica cuántica/mecánica molecular (QM/MM¹) son la mejor elección

¹ Del inglés **Q**uantum **M**echanics/**M**olecular **M**echanics.

disponible en estos momentos para estudiar grandes sistemas biomoleculares con confiabilidad, especialmente reacciones enzimáticas y procesos de la visión¹¹⁻¹⁴. En el presente año, se acaba de otorgar el Premio Nobel de Química a algunos de los desarrolladores de las bases de los procedimientos de modelación relacionados con estos métodos. En la actualidad, se dispone de conocimientos bioquímicos, datos de biología molecular sobre las proteínas que portan como cromóforo al retinal (proteínas retinales) e información estructural obtenida por difracción de rayos X de alta resolución para la rodopsina bovina¹⁵ que es también de un mamífero superior con alto nivel de selección natural como el humano. Lo anterior permite realizar aproximaciones adecuadas a la relación estructura—función para este prototipo de receptor acoplado a proteína G¹⁶. Varios estudios experimentales y computacionales están disponibles tanto para la rodopsina bovina normal como para mutantes de esta^{13,15-23} pero menos ha sido reportado para la rodopsina humana²⁴⁻²⁷. Se ha sugerido recientemente la importancia de investigaciones sobre el mecanismo etiopatogénico en RP, las cuales podrían ser especialmente valiosas en rodopsinas mutantes de la clase IIa, considerando avances recientes que permiten proponer moléculas estabilizadoras de proteínas con dificultad en el plegamiento²⁷. Entonces, los efectos de mutaciones sobre propiedades fotofísicas y fotoquímicas de rodopsinas que de alguna manera puedan plegarse, o ser estables, resultan también relevantes para propósitos médicos.

A pesar del amplio conocimiento alcanzado en los últimos años sobre los mecanismos de ajuste espectral en la rodopsina bovina¹³, las metodologías teórico—computacionales están siendo muy útiles no solo para comprender efectos moleculares sobre propiedades espectrales en rodopsinas mutantes²⁷⁻²⁹ sino también para el diseño racional de proteínas fotosensitivas artificiales³⁰ y la elucidación de los procesos iniciales de la visión¹³. Afortunadamente, se han implementado en los años finales del pasado siglo y en el presente métodos híbridos que permiten un cálculo acepta-

ble del espectro de absorción de regiones limitadas de grandes sistemas moleculares. Estos sitios estructurales pueden ser los de mayor relevancia a la excitación electrónica asociada con la interacción con la luz y deben ser tratados con la teoría cuántica, que por naturaleza requiere una alta complejidad de cálculos. La parte restante de un sistema biomolecular extenso (por ejemplo: las proteínas) es tratada con potenciales de mecánica molecular cuyas demandas computacionales son menores^{13,18} y por lo tanto requieren tiempos de cálculo razonables. Entre las aproximaciones cuánticas confiables para calcular propiedades espectrales en proteínas, se encuentran aquellas que vinculan la llamada “Teoría de Funcionales de la Densidad” (DFT²) con la “Interacción de Configuraciones Multireferencial” (MRCI³) y las DFT dependientes del tiempo (TDDFT⁴)^{13,31-33}.

Si bien el cálculo espectral de moléculas aisladas es posible con adecuada confiabilidad¹³, en cambio para muchas moléculas como las proteínas retinales sigue siendo una tarea desafiante^{34,35}. Además, aún se necesita una mejor descripción de la estructura electrónica del retinal para racionalizar adecuadamente su comportamiento espectral^{36,37}. Por ejemplo, características interesantes del sistema electrónico π conjugado del retinal no se han modelado con métodos avanzados; sin embargo, podrían ser útiles para explicar propiedades espectrales¹³. Tanto los métodos teórico—computacionales para describir propiedades de macromoléculas como la información bioquímica experimental disponibles pueden combinarse para lograr comprensiones necesarias sobre los efectos de mutaciones subyacentes en las patologías al nivel molecular. Actualmente, no existe una cura definitiva para ninguna de las formas de la RP, menos aún para los pacientes portadores de las variantes de causa genética en las que se afecta la

² Del inglés Density Functional Theory.

³ Del inglés Density Functional Theory/Multi—Reference Configuration Interaction.

⁴ Del inglés Time—Dependent Density Functional Theory.

estructura misma de la rodopsina. Este hecho constituye nuestro **problema práctico** y su solución definitiva implicaría resolver los mecanismos etiopatogénicos. Es incontrovertible que los variados mecanismos moleculares que pueden conducir a la RP sean considerados hoy en día como muy complejos, lo cual hace difícil la búsqueda de soluciones generales. De hecho, las mutaciones en el gen de la rodopsina pueden ocasionar diversas consecuencias estructurales y funcionales: desde la significativa dificultad hasta el impedimento total del plegamiento de la proteína o de su expresión, o la no unión del cromóforo 11—*cis*—retinal a la opsina³⁸.

Por otro lado, aunque se conocen consecuencias de ciertas mutaciones en la rodopsina, otros efectos son desconocidos como ocurre para la mutación S186W^{25,27,28,39,40} causante de RP⁴¹. Un estudio experimental reciente reportó que otra rodopsina mutante, la portadora del cambio M207R, exhibe cierto grado de plegamiento, unión con el cromóforo y absorción de luz²⁹, lo cual concuerda con una investigación teórica reciente que reportó muy poca desestabilización en esta misma rodopsina mutante respecto a otras de la misma clase²⁷. Sin embargo, el cambio M207R causa RP⁴¹. Las posiciones 207 y 186 están ubicadas cerca y en ambos extremos del retinal⁴² por lo que las mutaciones M207R y S186W pudieran afectar el proceso de fotoabsorción y el núcleo proteínico. Además de las incógnitas sobre los efectos de estas mutaciones que rinden rodopsinas mutantes clasificadas dentro de la clase IIa y asociadas a RP^{27,41}, el escenario estructural resultante en el pigmento visual es también conveniente para analizar mecanismos de ajuste espectral de proteínas retinales. Así, estas dos sustituciones aminoacídicas M207R y S186W son candidatas interesantes para explorar, mediante modelación molecular, las características moleculares que no son accesibles por experimentos.

Por consiguiente, podemos considerar que nuestro **problema científico** es la necesidad de conocer efectos de las mutaciones M207R y S186W para comprender eventos moleculares patogé-

nicos en la rodopsina humana mediante procedimientos de modelación molecular computacional. A su vez, la metodología a implementar aquí permite abarcar el estudio del proceso de fotoabsorción en proteínas retinales. La **hipótesis** de este trabajo radica en que si las sustituciones aminoácidas M207R y S186W pueden inducir cambios estructurales y electrónicos en el 11—*cis*—retinal y su sitio de unión en la rodopsina humana entonces podrían desestabilizar el núcleo proteínico de este fotopigmento, desviar la geometría óptima del cromóforo para la fotoisomerización y perturbar el espectro de absorción en los mutantes con el consecuente desbalance energético. Es posible evaluar estos efectos mediante herramientas de modelación molecular computacional. Por lo tanto, nuestro **objeto de estudio** consiste en la estructura de la rodopsina humana y sus mutantes con las sustituciones aminoácidas M207R y S186W en su interacción con la luz. El **objetivo general** del trabajo es seleccionar y establecer un sistema de métodos teórico—computacionales que permita la evaluación de estructuras tridimensionales, propiedades físico—químicas y efectos moleculares de rodopsinas humanas mutantes portadoras de los cambios M207R y S186W que puedan ser relevantes para la mejor comprensión de las causas de variantes de RP. Por lo que, nos proponemos los **objetivos específicos** siguientes:

1. Implementar una metodología de modelación molecular computacional para rodopsinas humana y sus mutantes con las sustituciones aminoácidas M207R y S186W que permita:
 - a) Obtener los modelos de las estructuras tridimensionales.
 - b) Comprender el proceso de fotoabsorción y propiedades físico—químicas.
 - c) Describir el sistema electrónico π conjugado del cromóforo retinal.
2. Evaluar en las rodopsinas humanas mutantes portadoras de las sustituciones aminoácidas M207R y S186W mediante métodos de modelación molecular computacional:
 - a) La estabilidad del sitio de unión del 11—*cis*—retinal.

- b) La geometría del 11—*cis*—retinal.
 - c) La estructura electrónica del 11—*cis*—retinal.
3. Analizar en las rodopsinas humana y mutantes humanas con las sustituciones aminoacídicas M207R y S186W mediante métodos de modelación molecular computacional:
- a) Los espectros de absorción.
 - b) Los efectos del desbalance energético causados por cambios en el espectro de absorción del 11—*cis*—retinal.

Es necesario profundizar en los eventos moleculares asociados con las sustituciones aminoacídicas que afectan a las rodopsinas mutantes de la clase II para contribuir a comprender la patogénesis de determinadas degeneraciones retinianas y así poder facilitar el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas^{5,27,43}. No han sido reportadas investigaciones sobre las mutaciones M207R y S186W clasificadas dentro de la clase IIa que faciliten la comprensión a un nivel molecular de sus efectos sobre el espectro de absorción, la geometría óptima para la reacción de fotoisomerización en el estado no activado de la rodopsina o las propiedades físico—químicas relacionadas con la actividad fotosensibilizadora del pigmento visual mutante.

Además, el cumplimiento de los objetivos propuestos nos permite también obtener como **novedad científica** que por primera vez: (i) se propone la combinación de los **métodos** de modelación molecular que se aplica en este trabajo, desde la simulación de dinámica molecular clásica hasta el método híbrido QM/MM, incluyendo nuevas aproximaciones a la estructura electrónica del retinal como cromóforo. Esta metodología permite obtener las estructuras 3D y predecir con confiabilidad propiedades aún desconocidas de rodopsinas humanas, siendo los resultados comparables con valores experimentales disponibles; (ii) se aplican con éxito métodos de avanzada que usan la teoría de funcionales de la densidad en el cálculo de propiedades espectrales de rodopsinas

humanas; (iii) se describe el patrón de deslocalización completo del retinal, incluyendo aquéllos que se encuentren asociados en las rodopsinas, mediante el cálculo con el novedoso método de las “Deformaciones de la Densidad Electrónica” (DAM⁵)⁴⁴, lo cual permitió racionalizar el comportamiento espectral de pigmentos visuales; (iv) se encuentra una dependencia directa entre propiedades geométricas y espectrales del retinal a través de una función cuadrática; y (v) se aprecian potencialidades de las rodopsinas para la generación fotosensibilizada de oxígeno singlete. Tales hallazgos pudieran contribuir a esclarecer vínculos directos entre el efecto de la luz en estos pigmentos visuales y la apoptosis de células fotorreceptoras.

En la actualidad, varios grupos de trabajo de buena consideración internacional están enfocados en promover el uso de métodos teóricos y computacionales en la solución de preguntas de interés para las ciencias de la vida. En este sentido, se propone la metodología que desarrollamos con fines explicativos y predictivos para estudiar eventos moleculares en variantes de RP causadas por mutaciones en el gen de la rodopsina. Esta implementación también puede ser útil en estudios sobre procesos iniciales de la visión y de mutagénesis dirigida relacionados con el diseño de proteínas fotosensitivas. Nuestros resultados, tanto los reportados en el informe de tesis como otros relacionados con el trabajo realizado en la temática, han sido publicados en revistas internacionales de alto impacto: *Journal of Computational Chemistry*⁴⁵ (*Inside Cover*⁴⁶), *Journal of Physical Chemistry B*⁴⁷ y *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*⁴⁸. Se prepara un nuevo manuscrito con resultados de interés contenidos en este informe para su publicación en una revista similar. Además, estos resultados han sido reflejados por 9 trabajos en eventos científicos internacionales.

⁵ Del inglés **D**eformed **A**toms in **M**olecules.

CAPÍTULO 1

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. Retinosis Pigmentaria

La Retinosis Pigmentaria es una condición patológica asociada con la ceguera que distingue un grupo heterogéneo de enfermedades hereditarias caracterizadas por una degeneración progresiva de la retina debido a la muerte de células fotorreceptoras³. Esta dolencia oftálmica referida también como *Retinitis Pigmentosa*, ha sido considerada por décadas como un problema creciente de salud pública¹, afectando aproximadamente a una de cada 3200 personas, lo cual equivale a 1,5 millones de individuos en el mundo¹⁰. Se han propuesto varias explicaciones para la etiopatogenia de la RP, implicando factores genéticos, vasculares, inmunológicos, así como, metabólicos relacionados con la matriz inter—fotorreceptora, el epitelio pigmentario² y el daño oxidativo⁴⁹⁻⁵⁶. Se ha establecido que los fotorreceptores mueren por apoptosis en la retina afectada por RP⁵⁻⁹ pero no se han esclarecido mecanismos primarios al nivel molecular que conecten directamente efectos de ciertas mutaciones con este patrón de muerte en células retinianas. Las actuales propuestas aún son insuficientes para explicar los disímiles eventos clínicos y moleculares de la RP². Al parecer, la causa genética no es la única “protagonista” en su patogenia.

Se ha encontrado una alta heterogeneidad genética para esta distrofia retiniana. Por ejemplo, más de 120 mutaciones puntuales han sido descubiertas en el gen de la rodopsina y la mayoría de estos cambios en el genoma causan RP autosómica dominante (RPAD)²⁸. Los pacientes que sufren este tipo de RPAD muestran inicialmente ceguera nocturna, pérdida progresiva de la visión periférica, y eventualmente la visión central, así como, una acumulación característica de un pigmento intraretinal nombrado lipofuscina, debido al cual estas distrofias adquieren su nombre^{2,28,57-61}. Si la mutación afecta los pigmentos visuales de los conos fotorreceptores, puede ocasionar la

muerte de estas células, pérdida de la visión central desde el inicio y dificultad para realizar tareas como la identificación de colores y la lectura⁵⁸.

Por otro lado, varias estrategias terapéuticas han sido propuestas y algunas logran determinadas mejorías pero el tratamiento definitivo no está disponible aún para ninguna de las diferentes variantes de RP^{2,3}. En nuestra opinión, la búsqueda de soluciones generales crea paradójicamente dificultades adicionales porque en realidad esta condición oftálmica consiste en un grupo de variantes clínicas sujetas a mecanismos etiopatogénicos distintos al nivel molecular. Por lo tanto, es crucial individualizar el estudio según la causa molecular para soluciones particulares en determinada variante hereditaria de RP. Son varias las proteínas y células que pudieran afectarse primariamente en las distrofias retinianas^{2,3}. Los fotorreceptores bastones están afectados en la RP típica, esta variante clínica es la más frecuente (aproximadamente el 90 % de los casos) y dentro de sus factores causales relevantes están las mutaciones en el gen de la rodopsina^{2,3}. En vertebrados, la rodopsina es el pigmento visual de los bastones⁴², los cuales están especializados para la visión en la oscuridad^{3,57} y la percepción de los colores blanco y negro por el sistema visual humano⁶².

1.2. Rodopsinas normales y mutadas

La rodopsina es el prototipo de la superfamilia de receptores acoplados a proteína G (RAPG)^{63,64}. Este pigmento visual es una proteína transmembranal expresada en la retina y compuesta por cuatro bloques de construcción: (a) una apoproteína llamada opsina con 348 residuos aminoácidos; (b) un cromóforo (retinal) unido covalentemente en un sitio específico del núcleo proteínico; (c) dos residuos palmíticos unidos a Cys322 y Cys323; y (d) dos residuos de azúcares unidos a Asn2 y Asn15^{13,42}. En el estado no excitado de la rodopsina, el cromóforo 11—*cis*—retinal está unido mediante una base de Schiff protonada (BSP) a la Lys296 en el sitio de unión del retinal

(SR) en la rodopsina (Figura 1). La absorción de un fotón cuya longitud de onda es aproximadamente 500 nm por la rodopsina⁶⁵ activa la reacción de fotoisomerización del 11-*cis*-retinal, el cual cambia así a su forma *trans* unida a la opsina pero ahora mediante una base de Schiff desprotonada (BSD)^{42,66}. Tal fotoisomerización ocurre con alta eficiencia para un rendimiento cuántico en el rango de 0,65 – 0,67^{16,66}. Estos eventos iniciales proporcionan la energía necesaria en la rodopsina para formar su estado activo^{17,67}.

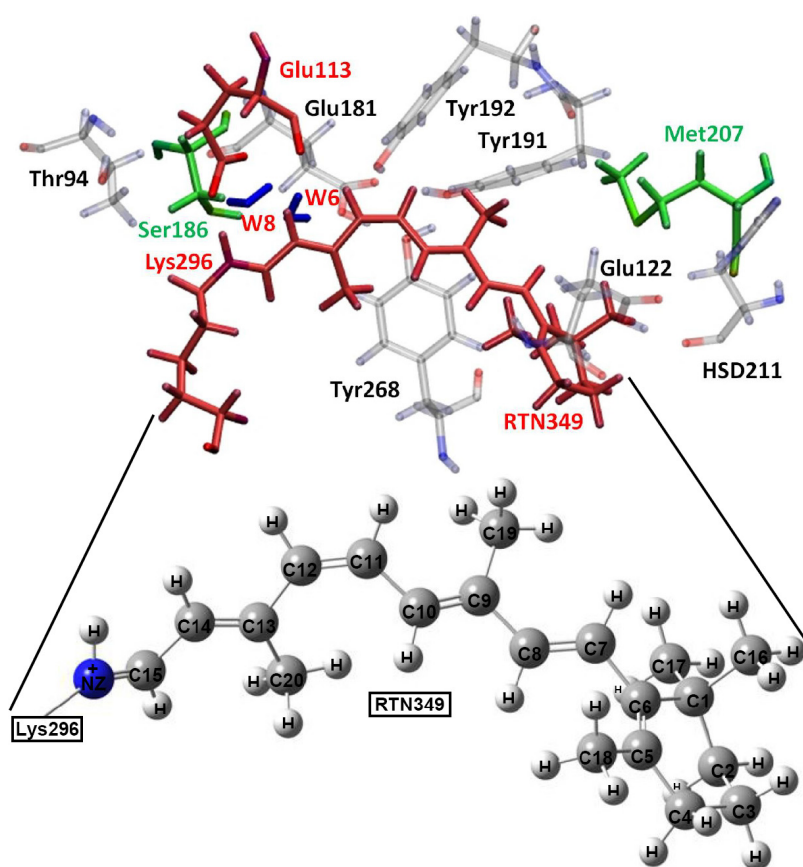


Figura 1. Sitio de unión del retinal en una estructura de rodopsina humana normal calculada en este estudio. La región de un modelo tratada con mecánica cuántica se visualiza en rojo (moléculas de agua en azul [W]) y en verde, los residuos a ser sustituidos en las rodopsinas mutantes M207R y S186W. La notación de los residuos corresponde a la misma usada en el fichero *1U19.pdb* del banco de datos de proteínas (PDB^a)⁶⁸, RTN349: 11-*cis*-retinal.

^a Del inglés Protein Data Bank.

El primer fotoproducto, fotorodopsina, existe durante un tiempo muy corto de 200 femtosegundos (fs) y se relaja térmicamente en unos pocos picosegundos (ps) a batorodopsina. A su vez, esta última establece el equilibrio con un intermediario que exhibe un cambio espectral hipsocrómico antes de formar la llamada lumirodopsina. El próximo intermediario es la llamada metarodopsina I, seguida por la metarodopsina II, que es la conformación activa para el acoplamiento con la proteína G. La formación de metarodopsina II implica el desplazamiento del protón de la base de Schiff al residuo aminoacídico Glu113, el cual desempeña el rol de contraión para la BSP en el estado no excitado de la rodopsina^{16,66}. Esta secuencia de eventos resulta en la iniciación de los mecanismos moleculares de la cascada de transducción de señales en el sistema visual. Tal cascada bioquímica de señalización resulta en el cierre de los canales de calcio dependientes de ligandos, lo cual conduce a la excitación del nervio óptico y la consecuente percepción de la luz por el cerebro^{15,16,18}. La metarodopsina II es convertida a metarodopsina III y posteriormente a opsina y 11-*trans*-retinal libre⁴².

Los eventos moleculares de la visión antes descritos ocurren sin dificultad en una rodopsina normal pero las sustituciones aminoacídicas debido a mutaciones en el gen de esta proteína pueden afectar su estructura y función de diversas formas. Las sustituciones del residuo aminoacídico Pro267 realizadas por experimentos de mutagénesis dirigida pueden afectar la estructura del sitio de reconocimiento molecular de la rodopsina para interactuar con la transducina. Además, tales cambios tienen implicaciones para el plegamiento de la opsina, la inserción en membrana, el ensamblaje y la función⁶⁹; en otros casos, se desconocen las consecuencias.

Por otro lado, se ha investigado sobre mutaciones asociadas a RP que afectan posiciones de los residuos de cisteína en la rodopsina, las cuales ocasionan una imposibilidad para la regeneración con el 11-*cis*-retinal y el desplazamiento del pigmento visual a la membrana plasmática⁷⁰.

Además, se ha documentado que el puente disulfuro formado entre los residuos Cys110 y Cys187 es necesario para un apropiado plegamiento y función de este receptor⁷¹. Las mutaciones que afectan al residuo Trp265 tienen consecuencias relevantes sobre el SR y las propiedades espectrales de la rodopsina⁶⁹. De forma similar, las sustituciones en los residuos aminoácidos Phe261 y Gly121 influyen en los primeros eventos moleculares de la fotoisomerización y causan intermediarios que exhiben corrimientos hipsocrómicos en el espectro de absorción⁷². Algunos estudios *in vitro* que usan rodopsinas recombinantes portadoras de sustituciones aminoácidas, asociadas con RP, en posiciones diferentes de la estructura del pigmento visual también mostraron un comportamiento espectral modificado²⁶. Asimismo, se han calculado diversos patrones de absorción de luz para los mutantes de rodopsina bovina E113Q, E181Q, G90D, A292S, A269T, H211C y D83N¹⁸.

Las mutaciones en el gen de la rodopsina humana que ocasionan las sustituciones aminoácidas M207R y S186W llevarían a cambios en el SR y causan RPAD^{27-29,41}. Sin embargo, como se menciona antes, un reciente estudio experimental²⁹ reporta que la mutación M207R permite en cierto grado el plegamiento de la rodopsina y su regeneración con el 11-*cis*-retinal, la cual es facilitada con el incremento de la concentración de este cromóforo. La absorción de luz ha sido también detectada para esta rodopsina mutante, sugiriéndose posibles cambios en el estado de protonación para la BSP de la rodopsina normal²⁹. Se ha documentado una ligera dificultad para el plegamiento en el segundo lazo extracelular (intradiscal) de la rodopsina debido a la mutación S186W²⁸. Esta mutación desestabiliza térmicamente a la rodopsina e incrementa la tasa de isomerización térmica⁴⁰. En un estudio teórico cualitativo anterior donde participó el autor de este trabajo, se informaron cambios espectrales del retinal usando un modelo muy limitado sin consi-

derar el ambiente proteínico perteneciente a rodopsinas mutantes, incluyendo aquellas portadoras de las sustituciones aminoacídicas M207R y S186W⁴⁸.

Muy recientemente, un estudio computacional desarrollado por Rakoczy *et al.* para mutaciones asociadas a RP que afectan la rodopsina incluyó a las sustituciones M207R y S186W²⁷. Los autores clasificaron las mutaciones atendiendo a sus efectos sobre la estabilidad y el plegamiento de la proteína, encontrando que ambas sustituciones causan desestabilización en algún grado²⁷. Ambos residuos sustituidos (186 y 207) son también cercanos al cromóforo 11-*cis*-retinal en la estructura 3D de la rodopsina humana (Figura 1). Por lo tanto, tales cambios aminoacídicos podrían perturbar las propiedades espectrales y geométricas del cromóforo en las rodopsinas mutantes.

1.3. Aproximaciones teóricas al espectro de absorción de la rodopsina

Aunque muchos estudios computacionales y experimentales en pigmentos visuales se han enfocado hacia la descripción de los mecanismos del espectro de absorción^{36,73-78}, el cálculo con confiabilidad de los espectros electrónicos de estas proteínas sigue siendo una tarea compleja e interesante^{34,75}. En las proteínas retinales, se han propuesto actualmente varios mecanismos para explicar sus propiedades espectrales: (i) cambios en la interacción del cromóforo con el contraión que balancea su carga positiva; (ii) cambios en la interacción del cromóforo con los residuos aminoacídicos restantes y moléculas de agua que revisten el sitio de unión del retinal; (iii) cambios en la geometría del cromóforo debido a interacciones con su sitio de unión y recientemente (iv) perturbaciones en la red interna de puentes de hidrógeno que tiene lugar dentro del sitio de unión del retinal^{30,62,79-84}.

Ciertas condiciones específicas son importantes para el cálculo adecuado del espectro de absorción³¹: (i) se tienen que usar métodos de alta confiabilidad, es decir, capaces de reproducir los

valores experimentales de referencia disponibles para el sistema; (ii) los parámetros geométricos del cromóforo tienen que ser descritos apropiadamente porque el espectro es altamente sensible a la geometría del cromóforo; (iii) los efectos de polarización del cromóforo por el ambiente tienen que ser incluidos en el cálculo; (iv) los efectos de dispersión deben ser considerados; y (v) es necesario un muestreo de las conformaciones de la proteína mediante dinámica molecular para calcular las energías verticales de excitación y los espectros que son comparables directamente con aquellos provenientes del experimento. La mayor parte de las aproximaciones confían en la optimización de la geometría, evaluando el espectro de absorción en un solo punto del espacio conformacional generado por las simulaciones. No obstante, esto no conduce necesariamente a estructuras representativas³¹. Por lo tanto, la descripción exacta del espectro óptico del retinal implica calcular de forma adecuada varias geometrías del cromóforo y sus energías verticales de excitación, considerando el ambiente proteínico de la opsina del pigmento visual^{13,18,75}.

Actualmente, las propiedades espectrales de la rodopsina bovina han sido estudiadas con razonable confiabilidad usando los métodos híbridos QM/MM¹³ para optimizar la geometría de la proteína. Por otro lado, métodos como DFT/MRCI³² y TDDFT⁸⁵⁻⁸⁸ son utilizados a un nivel QM/MM y con éxito para el cálculo del espectro de absorción en geometrías de proteínas retinales^{13,31}.

1.3.1. Método híbrido mecánica cuántica/mecánica molecular

El método combinado QM/MM permite tener en cuenta la estructura completa de la proteína y por tanto es apropiado para comprender eventos moleculares de la visión¹³ que tienen lugar en un sistema nanoscópico muy complejo. Los métodos de mecánica cuántica (QM) pueden describir propiedades y procesos como: reacciones enzimáticas, transferencia de carga o excitación electrónica^{11-13,89}. No obstante, sus aplicaciones están limitadas a sistemas con unos pocos cientos de átomos debido a su alta demanda computacional¹³. Por otro lado, los métodos de mecáni-

ca molecular clásica (MM) pueden incorporar el tamaño y la complejidad conformacional de miles de átomos en sistemas biomoleculares pero descartan los efectos electrónicos, que son solo explicables cuánticamente. Por ello, los métodos clásicos no pueden ser usados para describir procesos como la absorción de luz^{12,13}. Así, la aproximación lógica para modelar grandes biomoléculas es combinar las dos técnicas y usar el método de QM para la región activa químicamente (sustrato y cofactores en una reacción enzimática o un cromóforo en una proteína fotosensitiva), y un tratamiento MM para la parte restante y más extensa del sistema (resto de la proteína y el solvente). Esto último es eficiente, menos costoso y más rápido desde el punto de vista computacional con respecto a los métodos QM. Los métodos híbridos QM/MM también pueden ser aplicados al diseño, metabolismo y toxicidad de drogas¹⁴. Se han descrito los esquemas QM/MM sustractivo y aditivo para aproximaciones a sistemas biomoleculares¹²⁻¹⁴. En general, la metodología del método híbrido QM/MM implica la compartimentación del sistema en una región convencional tratada con mecánica cuántica y otra, dada por el resto del sistema, que es descrita con un campo de fuerza de mecánica molecular¹⁴, rindiendo los subsistemas QM y MM respectivamente, y el límite entre estos (QM—MM)¹².

En el modelo QM/MM, no puede ser escrita la energía de todo el sistema como la simple suma de la energía de los subsistemas debido a la relevancia de los términos que describen las fuertes interacciones QM—MM. Los términos de acoplamiento deben ser considerados, así como, se debe tener precaución en el límite entre subsistemas, especialmente si se cortan enlaces covalentes. Tales cortes deben ser evitados. Si el corte no puede obviarse debe ser a una distancia mínima de tres enlaces covalentes alejados de la región QM y en enlaces saturados entre carbonos. El acoplamiento electrostático entre la densidad de carga QM y el modelo de carga usado en

la región MM puede ser manejado a diferentes niveles de sofisticación y se distinguen esencialmente por la extensión de la polarización mutua entre sistemas¹².

Por lo tanto, la interacción entre los subsistemas QM y MM también puede ser computada con varios esquemas. El esquema más simple es de inserción mecánica (ME^b). En este esquema las interacciones electrostáticas entre los dos subsistemas son computadas con MM¹³. Sin embargo, en el esquema de inserción electrónica (EE^c), las cargas puntuales fijas de MM están incluidas como términos de un electrón en el Hamiltoniano de la región QM^{12,13}. El esquema EE permite incluir la contribución electrostática y la polarización de la función de onda QM por las cargas MM circundantes¹³ en la interacción QM—MM. La región límite QM—MM puede contener átomos adicionales (átomos de saturación) que sellan el subsistema QM y no son parte del sistema entero, o átomos con características especiales que aparecen en ambos subsistemas QM y MM¹². No obstante, los enlaces covalentes cortados en el borde QM—MM son generalmente saturados con átomos de hidrógeno que redistribuyen o suprimen las cargas MM vecinas, lo cual proporciona resultados competitivos con las aproximaciones más sofisticadas¹³. También, el tipo de partición puede ser fija, si el límite entre subsistemas QM y MM en el cálculo es definido una vez y permanece desde el principio, o adaptativa en caso de procesos con una región activa cambiante durante la modelación¹².

La aproximación QM/MM puede acomodar casi cualquier combinación de métodos QM y MM pero el código QM tiene que ser capaz de realizar el tratamiento del “campo autoconsistente” (SCF^d) en presencia del campo de cargas puntuales externas que representan el modelo de carga MM cuando se aplican esquemas de inserción distintos al ME¹². Actualmente, se ha generali-

^b Del inglés **M**echanical **E**mbedding.

^c Del inglés **E**lectronic **E**mbedding.

^d Del inglés **S**elf **C**onsistent **F**ield.

zando la aplicación de DFT como método QM debido a su favorable relación entre el esfuerzo computacional y la exactitud^{11,12}. Por otro lado, existen varias funciones clásicas de energía potencial (campos de fuerza) disponibles que contienen los términos de enlace, de van der Waals [tipo Lennard—Jones] y de interacción coulombica entre cargas puntuales rígidas para la adecuada descripción de la región MM¹². Los campos de fuerza más usados en grandes sistemas biológicos (proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos) son AMBER, CHARMM, GRO-MOS y OPLS-AA^{12,14,89}. Los métodos híbridos QM/MM han sido desarrollados para resolver las limitaciones de los métodos QM y MM por separado, siendo actualmente de elección y confiables para investigar sistemas biomoleculares muy extensos¹³.

1.3.2. Métodos de interacción de configuraciones multireferencial y dependientes del tiempo basados en la teoría de funcionales de la densidad

La teoría de funcionales de la densidad ha emergido como un método potente para calcular adecuadamente superficies de energía potencial de estados electrónicos. Esta teoría ha sido construida a partir de los teoremas de Hohenberg y Kohn⁹⁰. Tales teoremas establecen que: (i) la distribución de la densidad electrónica de un sistema determina completamente la energía de su estado base y que (ii) cualquier distribución de la densidad electrónica de un sistema corresponde con una energía superior o igual a la energía cuántica exacta del estado descrito del sistema, lo cual es un equivalente del teorema variacional pero ahora extendido a la densidad electrónica. Este enfoque, después de una importante adaptación, conduce a un método operacional con una favorable relación entre la confiabilidad y el esfuerzo computacional. La mencionada adaptación se refiere a que la densidad electrónica es obtenida a partir de una función de onda según el formalismo Kohn—Sham implementado en la mayor parte de las aplicaciones^{12,13}. Como se ha dicho, la energía y las demás propiedades moleculares son obtenidas en DFT a partir de la den-

sidad electrónica. Esta variante incorpora la correlación electrónica a través de los llamados funcionales de correlación—intercambio¹³. Entre ellos, los funcionales híbridos de correlación—intercambio, como uno muy conocido expresado por las siglas B3LYP, son los preferidos. Este funcional proporciona razonables valores de las dimensiones estructurales de cadenas de polienos, estén cargadas o no, tal y como es el caso del retinal como BSP o BSD¹³.

La idea básica del método DFT/MRCI de Grimme y Waletzke³² es que la mayor parte de la correlación electrónica debida a las interacciones del movimiento de los electrones sea tomada en cuenta por DFT, mientras que los efectos de la correlación estática dada por las interacciones entre electrones en diferentes cuerpos son incluidos en la expansión corta de la interacción de configuraciones. Las funciones de estado dadas en las configuraciones de la expansión MRCI son construidas a partir de los orbitales Kohn—Sham de un estado de referencia de capa cerrada. Los elementos diagonales del Hamiltoniano DFT/MRCI efectivo son construidos a partir de la expresión correspondiente basada en la teoría de Hartree—Fock y en un término de corrección específica de DFT. El Hamiltoniano DFT/MRCI efectivo contiene cinco parámetros empíricos, los cuales dependen solamente de la multiplicidad del estado excitado, el número de capas abiertas de una configuración, y el funcional de la densidad empleado. Actualmente, los conjuntos de parámetros optimizados están disponibles para el Hamiltoniano DFT/MRCI en combinación con el funcional BH—LYP⁹¹⁻⁹⁵.

El método TDDFT está basado en el teorema de Runge—Gross⁹⁶, al cual se le considera como el análogo del teorema de Hohenberg—Kohn en DFT para el estado base³³. Los resultados del estado base obtenidos con DFT son extendidos por la teoría dependiente del tiempo (similar a la ecuación de Schrödinger dependiente del tiempo) a estados excitados¹³. En sistemas con un número significativo de partículas, el teorema de Runge—Gross permite describir el comporta-

miento de la densidad electrónica sometida a un potencial externo dependiente del tiempo, como es la luz en su condición de oscilación periódica. En TDDFT, es posible describir un sistema a partir de otro utilizado como referencia, donde este último considera los electrones de forma independiente bajo un potencial externo cuya densidad electrónica es exactamente equivalente a la de un sistema real de electrones que interactúan³³. Por otro lado, aunque estos métodos que utilizan DFT son confiables para el cálculo del espectro de absorción de pigmentos visuales^{13,31}, se necesitan aproximaciones adecuadas a la estructura electrónica de los cromóforos para comprender los fundamentos del ajuste espectral en estas proteínas³⁶.

1.3.3. Aproximaciones a la estructura electrónica del retinal

Las perturbaciones en la distribución completa de la densidad electrónica del sistema retinal solo han sido investigadas indirectamente. Factores tales como la alternancia de longitud de enlace (ALE) de la cadena poliénica y la presencia de especies vecinas con cargas electrostáticas^{13,97} son influyentes en los cambios espectrales. Un principio general establece que cualquier mecanismo responsable de la reducción de la deslocalización de la carga e incremento de la ALE en polienos debe inducir cambios hipsocrómicos en el máximo de absorción y viceversa⁸⁴. Consecuentemente, la relación entre la distorsión geométrica y la energía vertical de excitación (EVE) ha sido estudiada a través de la deslocalización de la carga en el retinal¹³. Algunos estudios concuerdan en que el análisis de la estructura electrónica del retinal embebido en las opsinas de los pigmentos visuales es imprescindible para entender las bases estructurales de las propiedades ópticas de la rodopsina^{36,37}. Hasta ahora, aproximaciones indirectas a la estructura electrónica molecular del retinal son realizadas con frecuencia a través de análisis de orbitales fronteras, la alternancia de longitud de enlace del polieno, y del momento dipolo^{13,36,98}.

Los principios generales que gobiernan el espectro de absorción de cromóforos son básicamente conocidos⁸⁴, y varias veces reportados como esclarecidos a nivel molecular^{13,31,62,66,79}. Sin embargo, características importantes del patrón de deslocalización electrónica del retinal permanecen sin describir aunque ello proporcionaría una mejor comprensión de la estructura electrónica de este cromóforo en los estados base y excitados. De hecho, las perturbaciones en el sistema π conjugado pueden influir en las EVE pero estas perturbaciones no pueden ser adecuadamente modeladas sin un método que describa directamente las nubes π conjugadas en el retinal. Estudios previos han mostrado que el comportamiento químico de varios sistemas podría ser racionalizado apropiadamente por medio de las deformaciones atómicas pequeñas y no esféricas de la densidad electrónica proporcionada por el método Átomos Deformados en Moléculas (DAM)⁴⁴. Las deformaciones de la densidad electrónica, que vinculan el concepto mecánico cuántico de densidad electrónica con nociones de la química empírica⁹⁹, se han utilizado para describir sistemas π conjugados en varios compuestos retadores. El presente trabajo, se aproxima a la estructura electrónica del retinal como cromóforo en rodopsinas con el método DAM⁴⁴, lo cual es especialmente importante para racionalizar el comportamiento espectral en el contexto de sistemas con ambientes afectados como ocurre en proteínas fotosensitivas mutadas.

1.4. Mutaciones en rodopsina y susceptibilidad al daño fotoquímico en la retina

Recientemente, tanto las especies reactivas del oxígeno (ERO) como los efectos de la luz en la retina han sido reportados como factores importantes relacionados con la patogenia de degeneraciones retinianas y directamente con la apoptosis de los fotorreceptores^{49,50,52-56,100-102}. Además, ciertas mutaciones en el gen de la rodopsina y asociadas a RP pueden incrementar la susceptibilidad del tejido retiniano al daño inducido por la luz. Algunos estudios sugieren que una predisposición genética puede incrementar la susceptibilidad de la retina a la luz impactante^{5,52,103-105}. Sin

embargo, no existe evidencia directa que permita identificar la relación entre ERO y los eventos moleculares activados por la luz en un pigmento visual afectado por una mutación.

Por otro lado, el microambiente del retinal embebido en la opsina del pigmento visual puede ser drásticamente cambiado por las mutaciones que afecten no solo la parte proteínica del SR sino también propiedades química—físicas del cromóforo^{18,26,69,72,75,106}.

Una variante de daño fotoquímico puede tener lugar cuando la energía de un fotón es absorbida por una molécula fotosensitiva, la cual a su vez transfiere energía al oxígeno molecular en su estado base ($^3\text{O}_2$), formando la especie reactiva oxígeno singlete, $^1\text{O}_2$ ($\text{O}_2[{}^1\Delta_g]$)^{7,107-109}. Esta reacción se conoce como fotosensibilización y demanda solamente luz, una molécula fotosensibilizadora y oxígeno molecular, siendo una forma frecuente para generar $^1\text{O}_2$ ^{108,110}. Por ello ha sido de gran interés en los últimos 40 años¹¹¹. Un fotosensibilizador debe exhibir: (i) un alto coeficiente de absorción en la región espectral de la luz de excitación; (ii) un estado excitado triplete con apropiada energía para permitir su transferencia eficiente al estado no excitado del $^3\text{O}_2$; (iii) alto rendimiento cuántico y largo tiempo de vida del estado excitado triplete, ya que la eficiencia del fotosensibilizador es dependiente de las propiedades del estado excitado triplete más bajo; y (iv) alta fotoestabilidad¹¹², lo que implica reversibilidad en sus posibles fototransformaciones estructurales. No obstante, la formación fotosensibilizada de oxígeno singlete es muy favorecida en la naturaleza a causa de (i) la configuración electrónica especial del $^3\text{O}_2$; (ii) las bajas energías de excitación del primer, $\text{O}_2({}^1\Delta_g)$, y segundo, $\text{O}_2({}^1\Sigma_g^+)$ estado excitado del O_2 ; y (iii) el tamaño muy pequeño del O_2 , lo cual le permite difundir rápidamente en muchos medios. Difícilmente en la práctica del laboratorio y de la naturaleza en presencia de aire, algún proceso fotoquímico intermolecular sea capaz de competir con la desactivación por oxígeno molecular de una molécula fotosensitiva excitada, debido a la alta tensión atmosférica de O_2 ¹⁰⁸. En el caso de la célula viva, el oxígeno

singlete producto en algún proceso de fotosensibilización reaccionaría con moléculas cercanas y puede ser una de las causas de la oxidación de compuestos intracelulares, lo cual suele provocar cambios irreversibles y hasta la muerte celular¹¹³⁻¹¹⁵.

Por otro lado, la comprensión de los eventos moleculares asociados con los mecanismos de daño fotoquímico sigue siendo un problema subyacente en áreas de la visión, desde la patogenia de enfermedades oculares hasta los procedimientos oftalmológicos^{103,107,116-122}. En la retina, los mecanismos de daño fotoquímico fundamentales son conocidos como de tipo Noell y Ham^{5,107,120}. Evidencias crecientes sobre la base molecular del daño tipo Ham causado por la luz con frecuencias en el rango entre el ultravioleta A (UVA) y azul, permiten señalar razonablemente como factor relevante a la actividad fotosensibilizadora de la lipofuscina. Esta molécula absorbe en la región azul que coincide con el espectro de acción experimental de este tipo de daño^{49,107,123,124} y es abundante en la retina de los pacientes afectados en la RP típica (*vide supra*). Sin embargo, la lipofuscina es un producto resultante de reacciones oxidantes previas⁴⁹ y por lo tanto esta molécula, con un papel fotosensibilizador, no puede estar vinculada con los eventos oxidativos iniciales del daño fotoquímico debido a condiciones anormales en la retina. A lo largo de los años, el término “daño retiniano de tipo Noell” ha sido usado para describir el daño provocado por la luz con frecuencias en el rango entre el azul y verde. Este daño destruye primariamente los fotorreceptores pero sus bases moleculares no están esclarecidas aún^{103,120,121,125,126}.

El daño tipo Noell, también conocido como daño clase I, ha sido reportado en varias especies y pocos estudios han sido realizados en primates. Estos últimos no se han descartado dentro de las especies afectadas^{5,121,127}. En ratas, el daño clase I muestra un espectro de acción que coincide con la absorción de la rodopsina^{5,125}. Por lo tanto, los fotopigmentos como la rodopsina en vertebrados podrían paradójicamente estar asociados al daño fotoquímico retiniano debido a su

propio funcionamiento⁵. Mientras algunos estudios sugieren que los pigmentos visuales podrían estar implicados en el daño celular inducido por la luz^{107,116,118}, otras investigaciones aminoran el rol de estas proteínas para participar en reacciones fotosensibilizadoras^{103,121}. Si la rodopsina en su estado no excitado está implicada con la producción fotosensibilizada inicial de $^1\text{O}_2$, entonces es razonable que el residuo fotosensibilizador dentro de la estructura de este pigmento visual sea su cromóforo 11-*cis*-retinal. No obstante, la descripción de las propiedades fotoquímicas del retinal relacionadas con una potencial actividad fotosensibilizadora dentro de rodopsinas es una tarea desafiante en la actualidad.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Estructura de partida

Las estructuras calculadas están basadas en la estructura de la rodopsina bovina reportada por difracción de rayos X a una resolución de 2,2 angstroms (Å) y con el código de acceso del PDB: 1U19, donde está descrita en detalle y sin residuos aminoacídicos ausentes^{15,68}. Todas las estructuras contienen la cadena B que incluye a la opsina, el 11—*cis*—retinal y dos residuos de ácido palmítico unidos a los aminoácidos Cys322 y Cys323, así como, 29 moléculas de agua incluidas en el cristal de esta cadena (B).

Los iones metálicos y demás residuos no aminoacídicos fueron omitidos, lo cual incluye a los residuos de azúcares unidos a los aminoácidos Asn2 y Asn15. Tales azúcares están orientados hacia afuera en las estructuras y no son importantes para el plegamiento correcto de la opsina, la adecuada palmitilación y la unión del 11—*cis*—retinal. Por otra parte, no influyen en el característico máximo de longitud de onda ($\lambda_{\text{máx}}$) a aproximadamente 500 nm, de acuerdo con resultados experimentales reportados¹²⁸.

Se selecciona esta rodopsina como estructura molde porque: (i) su función, topolocalización en las células bastones y sus propiedades espectrales en el vertebrado *Bos Taurus* son muy similares a las que exhibe la rodopsina del *Homo Sapiens*^{42,65,129,130}; (ii) la rodopsina bovina es la proteína que muestra la identidad de secuencias más elevada con la rodopsina humana; de acuerdo tanto con la información documentada¹³¹ como con los filtrados de bases de datos y los alineamientos realizados en este trabajo (*vide infra*); (iii) esta estructura de partida es la de mayor resolución reportada hasta el momento para rodopsinas no activadas de vertebrados^{15,68}; y (iv) este trabajo hace referencia a valores teóricos importantes obtenidos por estudios que utilizaron la estructura 1U19^{18,62,75}.

2.2. Modelación por homología

Las estructuras 3D fueron generadas por técnicas de modelación por homología¹³² usando como molde a la estructura de la rodopsina bovina descrita antes. Este tipo de modelación se aplicó para las rodopsinas normales y mutantes analizadas en el estudio.

Rodopsinas normales:

- **bWT**: estructura 3D de la rodopsina bovina normal (salvaje) o WTⁱ, calculada a partir de su propia estructura experimental con la misma metodología usada para la humana, con el fin de lograr mejor homogeneidad en las comparaciones y consistencia.
- **hWT**: estructura 3D de la rodopsina humana WT.

Rodopsinas mutantes:

- **hM207R**: estructura 3D de la rodopsina humana mutante portadora de la sustitución aminoacídica M207R asociada a RP.
- **hS186W**: estructura 3D de la rodopsina humana mutante portadora de la sustitución aminoacídica S186W asociada a RP.

Los datos de las mutaciones M207R y S186W fueron recolectados en las bases de datos de la Asociación Internacional de Retinosis Pigmentaria (IRPA)⁴¹. Las proteínas homólogas fueron identificadas con una herramienta básica de búsqueda de alineamiento local (BLAST^k)¹³³. La secuencia de la rodopsina humana, obtenida de las bases de datos TrEMBL y SWISS—PROT del Servidor de Biología Molecular (ExPASy)¹³⁴, alcanzó un porcentaje de identidad significativo de aproximadamente 93 % con el cristal de la rodopsina bovina (1U19¹⁵), una vez realizado el alineamiento de secuencias (Figura A1; Anexos). Las estructuras de homología fueron construidas

ⁱ Del inglés **W**ild **T**ype.

^j Del inglés **I**nternational **R**etinitis **P**igmentosa **A**ssociation.

^k Del inglés **B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool.

usando MODELLER v.9v7¹³⁵; sus puentes disulfuro Cys110—Cys187 fueron generados apropiadamente. Los residuos palmíticos conectados a los aminoácidos Cys322 y Cys323 en la rodopsina bovina fueron conservados para cada estructura 3D, junto con las 29 moléculas de agua incluidas en el cristal 1U19.

Se calcularon cinco estructuras para cada sistema con todos los átomos de hidrógeno incluidos. Las posiciones de las moléculas de agua internas están en excelente concordancia con los sitios de esa molécula resueltos experimentalmente en la estructura del cristal disponible para la rodopsina bovina, incluyendo dos de estas cercanas al cromóforo dentro del SR, y de acuerdo con lo esperado para los mutantes. Las estructuras calculadas por homología fueron optimizadas por el método de la función objetivo variable (VTFM^l) con el algoritmo gradiente conjugado (CG^m), así como refinadas usando dinámica molecular (MDⁿ) clásica con “templado simulado” (simulated annealing)^{135,136}. Se seleccionó aquella estructura para cada uno de los sistemas bWT, hWT, hM207R, y hS186W, que mostró el valor menor para la “energía discreta” de la proteína optimizada (DOPE^o) usando la función de energía estándar de la herramienta MODELLER¹³⁵.

2.3. Cálculo de los valores de pK_a

Los valores de pK_a fueron calculados para todos los residuos aminoácidos disociables en las estructuras bWT, hWT, hM207R, y hS186W con todos los átomos, excepto los de hidrógeno. Se incluyeron en el cálculo a: (i) la proteína, (ii) los ligandos (11—*cis*—retinal y residuos palmíticos) y (iii) las moléculas de agua.

^l Del inglés **V**ariable **T**arget **F**unction **M**ethod.

^m Del inglés **C**onjugated **G**radient.

ⁿ Del inglés **M**olecular **D**ynamics.

^o Del inglés **D**iscrete **O**ptimized **P**rotein **E**nergy.

Se usó el programa PROPKA v.2.0¹³⁷ no solo para los cálculos de los valores de pK_a sino también para explorar la estabilidad de la proteína como función del pH, la interacción entre residuos y la red de puentes de hidrógeno en el SR.

2.4. Estimación de los estados de protonación

Se consideró la inspección visual, los valores de pK_a computados y los valores de pH experimentales reportados para los fotoreceptores bastones de vertebrados¹³⁸ con el propósito de asignar los estados de protonación a todos los residuos disociables. Así, el valor de pH citoplasmático ($7,29 \pm 0,02$) fue tomado en cuenta para los dominios transmembranales y citoplasmáticos, y $6,50 \pm 0,07$ para los residuos aminoácidos situados en el espacio intradiscal. Los residuos Asp83, Glu122 y Glu181 resultaron protonados (sin carga) para los sistemas bWT, hWT y hS186W. Esta predicción para los dos primeros residuos (Asp83 y Glu122) está en excelente correspondencia con experimentos de espectroscopia infrarroja de transformadas de Fourier (FTIR^p) y ultravioleta—visible (UV—Vis) sobre rodopsinas bovinas modificadas en estudios de mutagénesis dirigida^{139,140}. Los residuos Asp83 y Glu181 fueron protonados, y Glu122 fue desprotonado en el mutante hM207R.

El estado de protonación del residuo Glu181 en las rodopsinas de vertebrados no ha sido establecido inequívocamente. Se ha sugerido que el residuo Glu181 se encuentra cargado a partir de resultados provenientes de mediciones espectroscópicas por resonancia magnética nuclear¹⁴¹⁻¹⁴³ y espectroscopia FTIR, así como, de simulaciones de dinámica molecular¹⁶ y un estudio reciente con la aproximación QM/MM¹⁴⁴. Por otro lado, los estudios de espectroscopia bifotónica¹⁴⁵ y de mutagénesis dirigida con espectros vibracionales tipo Raman para el mutante E181Q (no fotolizado)¹⁴⁶ sobre estructuras cristalinas de rodopsinas reportadas¹⁵ indican que el residuo Glu181

^p Del inglés Fourier—transform Infrared.

no se encuentra cargado en el estado no excitado del pigmento visual. Por lo tanto, en los primeros modelos QM/MM el estado protonado del Glu181 en el SR fue asumido debido a estos últimos estudios¹⁴⁶. Por otro lado, se ha enunciado que el estado de protonación del Glu181 no actúa de forma importante sobre la alternancia de las longitudes de enlace o sobre el espectro óptico de la rodopsina¹⁴⁴. En el trabajo que se presenta aquí, el residuo aminoacídico Glu181 apareció neutro en todos los sistemas estudiados.

En las estructuras analizadas, los residuos His100 e His211 fueron protonados solo en el nitrógeno δ , así como, His195 en la estructura bWT. Los residuos His65 y His152 siempre resultaron solamente protonados en el nitrógeno ϵ . El estado de protonación de estos residuos de histidina coincidió con lo reportado en estudios anteriores¹⁵. El residuo His278 (intradiscal) presentó como protonados ambos átomos de nitrógeno. El residuo aminoacídico Cys316 apareció cargado en los mutantes, lo cual no es importante para la absorción de luz en el estado no excitado de la rodopsina sino para la activación de la transducina¹⁴⁷. Como se mencionó antes, los residuos aminoacídicos Cys110 y Cys187 (no protonados) formaron el puente disulfuro reportado para la rodopsina^{15,42} en todas las estructuras 3D calculadas.

El residuo Glu113 resultó cargado negativamente y localizado cerca de la carga positiva de la BSP en las estructuras bWT, hWT y hM207R. Esta asignación de estados de protonación para Glu113 y la base de Schiff (BS) está bien establecida para rodopsinas WT^{15,42}. Previa evidencia experimental basada en espectros de absorción ha sido interpretada en términos de una BSD en el mutante hM207R²⁹, pero nuestros cálculos predicen un comportamiento espectral similar en este mutante con un valor de pK_a^{BS} que sugiere una BSP. En cambio, en el mutante hS186W, los valores de pK_a computados (por ejemplo, $pK_a^{Glu113} = 8,31$ y $pK_a^{BS} = 5,88$) indican que se rompería el puente salino entre el residuo Glu113 neutro y la BSD. De este modo, se adopta una estructura

para el mutante hS186W en la cual tanto Glu113 y BS son neutros. Se usaron estados de protonación estándares para todos los demás residuos aminoacídicos en todas las estructuras analizadas.

2.5. Optimización por mecánica molecular

Se refinaron las estructuras de homología con los estados de protonación asignados, minimizando su energía con la herramienta NAMD v.2.7¹⁴⁸ y el algoritmo CG, a una temperatura de 310 K y presión de 1,0 bar. Las estructuras resultantes se usaron como punto de partida para cálculos subsecuentes.

2.6. Validación estructural

Fueron usadas varias y diferentes herramientas de validación para analizar la confiabilidad y consistencia interna de las estructuras 3D computadas de rodopsinas normales y mutantes. La compatibilidad secuencia—estructura fue evaluada con VERIFY—3D¹⁴⁹, la conformación del esqueleto covalente de la proteína fue inspeccionada mediante el mapa de Ramachandran (Psi/Phi) obtenido a partir del análisis con PROCHECK¹⁵⁰ y la calidad de empaquetamiento de las estructuras 3D fue analizada mediante cálculos del valor de puntuación Z realizados con la herramienta WHAT_CHECK¹⁵¹. Además, se calculó la raíz cuadrática de la desviación estructural promedio (RMSD^q) entre cada estructura 3D calculada por homología y la rodopsina de partida (1U19) para explorar sus similitudes estructurales. Los programas se ejecutaron desde sus servidores de análisis y verificación de estructuras ubicados en los sitios: http://www.doe-mbi.ucla.edu/Services/Verify_3D/ (VERIFY—3D), <http://www.ebi.ac.uk/thorntonsrv/software/PROCHECK/> (PROCHECK), y <http://swift.emblheidelberg.de/whatcheck/> (WHAT_CHECK).

^q Del inglés Root—Mean—Square Deviation.

2.7. Simulaciones de dinámica molecular

Se usaron dos alternativas diferentes de simulaciones: (i) con las rodopsinas en solvente explícito de agua (MD₁); y (ii) con las rodopsinas insertadas en una bicapa lipídica doblemente hidratada de palmitoil—oleoil—fosfatidil—colina (POPC^r), (MD₂) (Figura 2). A su vez, dos variantes fueron aplicadas para las simulaciones MD₂: (i) con la proteína restringida (MD₂^R) en todos los sistemas (bWT, hWT, hM207R, y hS186W) insertados en la membrana para reproducir geometrías cercanas a la estructura del cristal; y (ii) con la proteína libre de restricciones (MD₂^L) en sistemas normales con BSP (bWT y hWT), y un mutante con BSD (hS186W) para explorar el efecto de desviaciones conformacionales significativas sobre el espectro de absorción.

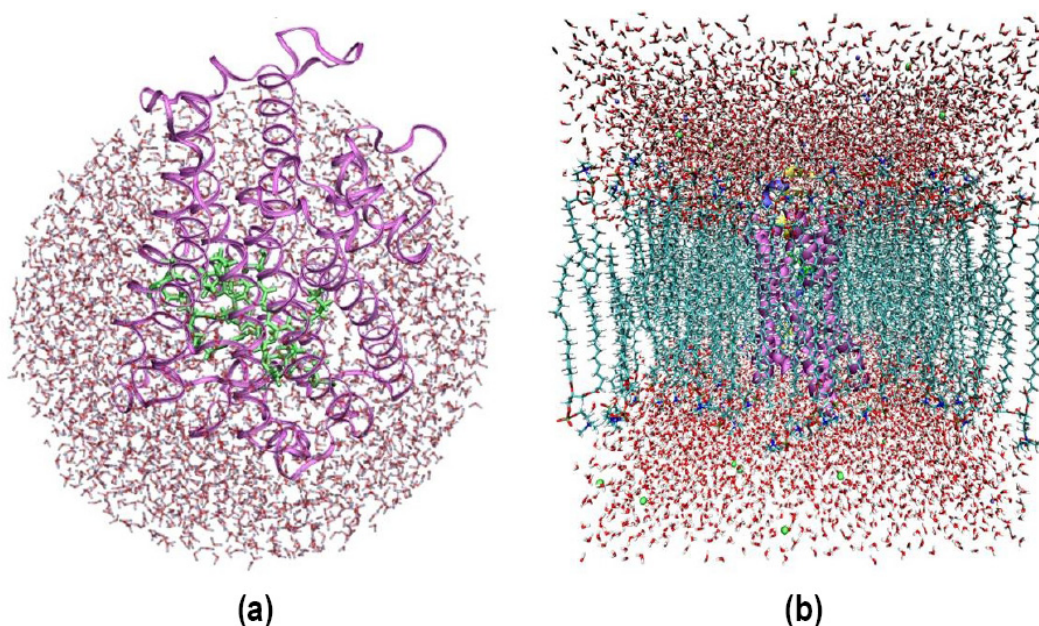


Figura 2. a) rodopsina en solvente explícito; b) complejo rodopsina/membrana/aguas/iones.

2.7.1. Dinámica molecular de las rodopsinas en solvente explícito de agua

Las simulaciones MD₁ fueron llevadas a cabo usando el programa CHARMM v.33b1^{152,153}. El conjunto inicial de coordenadas usadas para cada MD₁ fueron tomadas de las estructuras bWT,

^r También del inglés Palmitoyl—Oleoyl—Phosphatidyl—Choline.

hWT, hM207R y hS186W derivadas de la modelación por homología. Se aplicaron restricciones tipo SHAKE¹⁵⁴ a todos los enlaces que implican átomos de hidrógeno. El sistema fue solvatado, después del ajuste inicial, en una esfera pre-equilibrada de moléculas de agua (modelo TIP3P¹⁵⁵) con un radio de 30 Å y enclavada en el origen del sistema de coordenada (átomo C₁₁ del 11-*cis*-retinal). Se usó un potencial cuartico para el límite de la esfera del solvente que actuó sobre los átomos de oxígeno de las moléculas de agua. Los átomos de la proteína situados 20 Å más allá del centro del sistema de coordenadas estuvieron congelados (inmóviles) en todos los cálculos subsiguientes. Las moléculas de agua superpuestas (distancia entre el oxígeno de una molécula de agua y cualquier átomo pesado < 2,8 Å) fueron removidas después de la colocación inicial de la esfera de agua. Se minimizó la energía de las moléculas de agua retenidas usando 250 ciclos de minimización con cada uno de los procedimientos: steepest—descent y ABNR^s.

Las posiciones de todos los átomos no pertenecientes a moléculas de agua fueron congeladas en esta etapa. Posteriormente, los átomos de la proteína fueron restringidos por un fuerte potencial armónico y entonces se minimizó la energía de la proteína y de las moléculas de agua usando el mismo procedimiento anterior. Después de esta minimización, los átomos de la proteína y de las moléculas de agua fueron sometidos a una MD de 15 ps a temperatura constante con intervalos temporales (time step) de 1,0 fs, aplicando una temperatura de partida de 50 K, una temperatura final de 300 K y un incremento de temperatura de 10 K cada 100 pasos de MD. Subsecuentemente, una nueva esfera de agua fue impuesta sobre el sistema, los átomos solapados fueron eliminados y todo fue sujeto otra vez a una MD de 15 ps usando restricciones armónicas más débiles sobre los átomos de la proteína. Este procedimiento fue realizado 12

^s Del inglés Augment Basis Newton—Raphson.

veces, cada vez disminuyendo las restricciones armónicas sobre los átomos proteínicos. En los tres últimos ciclos, se incrementó el tiempo de equilibrio a 30 ps. Finalmente, una MD a temperatura constante fue realizada durante 500 ps con los mismos intervalos temporales. Otra vez, la temperatura fue elevada desde 50 K a 300 K en incrementos de 10 K cada 100 pasos de MD al inicio. El programa VMD v.1.8.7¹⁵⁶ fue usado para visualizar todas las trayectorias de MD₁ y las geometrías resultantes.

2.7.2. Dinámicas moleculares de las rodopsinas en la bicapa lipídica hidratada

La simulación de las rodopsinas dentro de su ambiente nativo con una bicapa lipídica hidratada está apoyada por datos experimentales, los cuales aportan que la funcionabilidad de estos pigmentos visuales es reconstituida en membranas artificiales¹⁵⁷. Por otro lado, algunos estudios teóricos han reproducido muy bien las propiedades del pigmento visual bovino en membranas¹⁶. Las membranas de los discos de los segmentos externos de los bastones, donde se inserta la rodopsina, están compuestas por lípidos insaturados¹⁵⁸ y fosfolípidos⁴². Por lo tanto, las rodopsinas, orientadas en el eje z, fueron insertadas en un parche rectangular de una bicapa lipídica doblemente hidratada de POPC (*vide supra*) usando el programa VMD v.1.8.7¹⁵⁶.

Las moléculas de agua adicionales se ubicaron usando el programa SOLVATE v.1.0¹⁵⁹ para llenar los espacios vacíos dentro de los poros y en sus alrededores. Se removieron las moléculas de agua dentro de la interface rodopsina—membrana y se determinó la colocación de la rodopsina dentro de la membrana de POPC según la hidrofobicidad de sus residuos. Se obtuvo un alineamiento proteína—membrana adecuado y se eliminaron las moléculas de POPC y agua superpuestas con la rodopsina y los residuos palmíticos. Subsecuentemente, se situaron los complejos en una caja de agua con talla ligeramente más pequeña que el plano xy del parche de membrana y se eliminó cualquier molécula de agua dentro de la bicapa lipídica. Los sistemas

fueron neutralizados usando iones Na^+ y Cl^- a concentración fisiológica (154 mM). Los complejos rodopsina/membrana/aguas/iones resultantes con dimensiones de $83 \times 84 \times 87 \text{ \AA}^3$ contienen las estructuras por homología, 170 moléculas de POPC, moléculas de agua e iones (Figura 2b). La mayor parte de las tareas en la construcción de los complejos rodopsina/membrana/aguas/iones fue realizada usando el programa VMD v.1.8.7¹⁵⁶. Todas las minimizaciones y MD con las rodopsinas insertadas en membrana lipídica doblemente hidratada fueron realizadas usando la herramienta NAMD v.2.7¹⁴⁸ con un tiempo de simulación total de tres nanosegundos (ns).

En la simulación MD₂^R: la minimización de energía inicial fue realizada sobre el complejo rodopsina/membrana/aguas/iones usando el algoritmo CG a 300 K, presión de 1,0 bar y volumen constante seguido por una MD de 500 ps con todos los residuos inmóviles, excepto las colas de las moléculas del lípido POPC y los residuos palmíticos. También se usaron condiciones periódicas del límite (CPL). Las interacciones electrostáticas para los sistemas completos con CPL fueron calculadas con el método de malla de partícula Ewald¹⁶⁰, usando un espaciado de rejilla de 1,0 Å, cutoff de 12,0 Å e intervalos temporales de 1,0 fs. Se indujo así el grado de aleatoriedad estructural apropiada de una bicapa lipídica fluida. Después, una segunda minimización de energía de los complejos fue realizada para equilibrar los sistemas (500 ps a 300 K y presión constante de 1,0 bar como en la MD inicial) antes de llevar a cabo otra simulación pero ahora con los átomos móviles. Las constricciones armónicas fueron impuestas sobre la proteína y el retinal de todas las rodopsinas. Esta simulación permitió la adaptación de moléculas de lípidos, agua, e iones a la proteína en su conformación dentro de un ambiente relajado apropiadamente, evitando desviaciones significativas en regiones del esqueleto covalente y del cromóforo con respecto a la estructura obtenida por difracción de rayos X¹⁶¹. Además, la hidratación de la interface proteí-

na—membrana fue evitada durante la MD₂^R. Después de este procedimiento de MD con restricciones, se continuó con la simulación no restringida como se describe a continuación.

En la MD₂^L, los sistemas fueron calentados a 310 K durante una simulación de 500 ps a presión constante de 1,0 bar y sin restricciones armónicas. Se realizó una corrida de MD posterior durante 1,5 ns a presión (1,0 bar) y área constantes para forzar desviaciones conformacionales en algunos sistemas (bWT, hWT y hS186W) dentro del ambiente de la membrana. El programa VMD v.1.8.7¹⁵⁶ fue usado para visualizar todas las trayectorias de las simulaciones MD₂ y las geometrías resultantes.

2.8. Optimización por el método híbrido mecánica cuántica/mecánica molecular

Las optimizaciones QM/MM de cuatro estructuras de cada sistema (bWT, hWT, hM207R, y hS186W) obtenidas a partir del espacio conformacional generado por la simulaciones MD₁, así como de tres estructuras de cada sistema (bWT, hWT y hS186W) obtenidas por MD₂^L, fueron realizadas con el programa ChemShell^{162,163}. Se usaron los programas Turbomole v.5.7.1¹⁶⁴ para los cálculos con los métodos de QM y DL_POLY¹⁶⁵ como conductor del campo de fuerza CHARMM22^{166,167}.

La región tratada con QM para bWT, hWT y hM207R (73 átomos) incluyó al cromóforo 11—*cis*—retinal, parte de los residuos Lys296 y Glu113, así como, las dos moléculas de agua (TIP3P) W6 y W8. La región QM para el sistema hS186W fue la misma (73 átomos), con una excepción: un protón fue cambiado desde el átomo N_z en el residuo Lys296 hasta el grupo carboxílico del residuo Glu113; por lo tanto, ambos residuos fueron neutros en este mutante (Figuras 1 y 3). Las optimizaciones QM/MM se realizaron para los estados singlete base (S_0) y triplete excitado más bajo (T_1) de la región QM en los sistemas provenientes de la dinámica molecular MD₁, y para S_0 de la región QM en los sistemas obtenidos a partir de la simulación

MD₂. Se cambió a la correspondiente multiplicidad, así como, se usó el formalismo Hartree—Fock restringido y sin restricciones para los estados S_0 y T_1 , respectivamente. La parte QM fue descrita usando el funcional de la densidad B3LYP⁹¹⁻⁹⁵ y la base TZVP de la biblioteca del conjunto de bases de la herramienta Turbomole¹⁶⁴. Las interacciones QM—MM fueron tratadas mediante un esquema de inserción electrónica (EE)¹⁶⁸. Las valencias no completadas en el límite QM—MM fueron saturadas usando átomos de hidrógeno. La aproximación de cambio de carga^{169,170} fue utilizada para evitar la sobrepolarización de la región QM en el límite. No se usaron cutoffs electrostáticos para la interacción QM—MM.

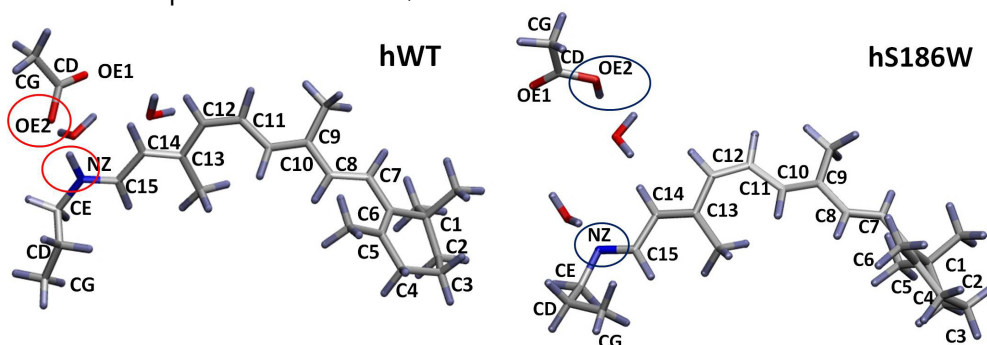


Figura 3. Regiones QM con la notación de los átomos (excepto para los átomos de hidrógeno, los grupos metilos y moléculas de agua). A la izquierda: rodopsina hWT (idéntico para bWT y hM207R); a la derecha: hS186W. Las diferencias entre ambas regiones QM son resaltadas.

Las optimizaciones de las geometrías fueron realizadas con el optimizador HDLC¹⁷¹ como se encuentra implementado en ChemShell, lo cual fue llevado a cabo usando coordenadas internas deslocalizadas híbridas. Se fijaron aquellas coordenadas más allá de 15 Å del centro (átomo C₁₁ del 11—*cis*—retinal). La optimización fue finalizada cuando el componente del gradiente máximo estuvo por debajo de 0,00045 unidades arbitrarias.

2.9. Parámetros y campo de fuerza

Todos los cálculos MM, sean puros (MM) o combinados (QM/MM), fueron realizados con el campo de fuerza CHARMM^{166,167} para todos los átomos y con el modelo de agua TIP3P¹⁵⁵. Los

tipos, cargas y parámetros del campo de fuerza para los átomos de los residuos aminoacídicos y no aminoacídicos como el retinal o los residuos palmíticos, así como, para moléculas de agua e iones fueron tomados de la literatura o la biblioteca de CHARMM^{166,172-175}.

2.10. Cálculo de propiedades geométricas del retinal

Se calcula la ALE como la suma de todas las longitudes de enlaces simples formales menos la suma de todas las longitudes de enlaces dobles formales a lo largo de la cadena carbonada y conjugada del retinal desde el átomo N_z hasta el C₆⁹⁸. La torsión geométrica helicoidal fue analizada a lo largo de la cadena polieno del retinal mediante ángulos entre planos (ω) y ángulos diedros (ϕ). Se calcula la torsión arqueada también a través de ángulos entre planos definidos por dos puntos con coordenadas (x, y, z) que corresponden a dos átomos del 11-*cis*-retinal (x_1, y_1, z_1 y x_2, y_2, z_2) y un tercer punto con coordenadas (x_3, y_3, z_3) iguales a aquellas de un átomo del mismo plano pero con el valor de z_3 ajustado a cero ($x_3 = x_1, y_3 = y_1, z_3 = 0$). Las torsiones helicoidales y arqueadas del retinal son exploradas en sitios específicos donde se encontraron cambios relevantes de la densidad electrónica. Cada ángulo entre planos fue calculado a través de la ecuación:

$$\omega = \arccos\left(\frac{\mathbf{N}_1 \cdot \mathbf{N}_2}{|\mathbf{N}_1| |\mathbf{N}_2|}\right)$$

donde $\mathbf{N}_1$ y $\mathbf{N}_2$ son los vectores ortogonales de los planos correspondientes.

2.11. Cálculo de las energías verticales de excitación

Se calcularon las energías verticales de excitación y la fortaleza del oscilador en el ambiente de la proteína a un nivel QM/MM, usando el método combinado DFT/MRCI³². El método TDDFT⁸⁵⁻⁸⁸ fue también usado para las comparaciones. Se usaron convenciones QM/MM iguales que para las optimizaciones (*vide supra*) y un conjunto modificado de parámetros desarrollados recientemente en el grupo de Grimme¹⁷⁶ ($p_1 = 0,629, p_2 = 0,611, p_J = 0,119, p[0] = 8,000, \alpha = 0,503$). Se

generaron las funciones de onda DFT requeridas mediante el programa Turbomole¹⁶⁴. El método DFT/MRCI puede proporcionar energías verticales de excitación que oscilan en 0,2 electron-voltios (eV) con respecto a valores experimentales, usando parámetros y convenciones estándares^{32,177}.

2.12. Cálculo de la densidad electrónica

2.12.1. Descripción de orbitales frontera y de distribuciones de carga

Se analizó la distribución de la densidad electrónica de la región QM, desde el punto de vista clásico, mediante el análisis de las distribuciones de carga NBO^t y de orbitales moleculares frontera: el ocupado de mayor energía (HOMO^u) y el desocupado de menor energía (LUMO^v). Esta aproximación permitió identificar la diferencia entre sistemas para las distribuciones de cargas atómicas y la ubicación de los orbitales HOMO y LUMO en la región QM.

2.12.2. Cálculo de las deformaciones de la densidad electrónica

Se realizaron cálculos con geometría fija a un nivel de teoría B3LYP/TZVP (que es una convención igual a la usada en las optimizaciones QM/MM) mediante el programa Gaussian09¹⁷⁸ para computar la densidad electrónica. Posteriormente, se realizó una aproximación novedosa a la estructura electrónica del retinal a partir de las deformaciones de la densidad electrónica. En este trabajo, el método DAM⁴⁴ desarrollado por Rico *et al.* fue empleado para analizar la densidad electrónica del 11—*cis*—retinal. Este método está basado en esquemas de partición centrada en átomos dentro del marco de la combinación lineal de orbitales atómicos (LCAO^w)^{99,179}. En ese contexto, la densidad electrónica es expresada como una combinación lineal de distribuciones de

^t Del inglés **N**atural **B**ond **O**rbital.

^u Del inglés **H**ighest **O**ccupied **M**olecular **O**rbital.

^v Del inglés **L**owest **U**noccupied **M**olecular **O**rbital.

^w Del inglés **L**inear **C**ombination of **A**tomical **O**rbital.

carga de uno o dos centros, y cada fragmento atómico consiste de todas sus distribuciones de un centro más la parte de las distribuciones de los dos centros más cercanos a este¹⁷⁹. Este método permite que las deformaciones pequeñas y no esféricas de la densidad electrónica de cada átomo, que son las indicativas del comportamiento químico⁴⁴, sean separadas del término esférico mayormente dominante¹⁸⁰. Lo anterior proporciona una comprensión apropiada de la densidad electrónica molecular, así como que permite identificar regiones de acumulación y reducción de densidad electrónica de acuerdo con las nociones de la química empírica^{99,179}.

El sistema π conjugado del retinal fue explorado a través de isosuperficies de deformaciones de la densidad electrónica. Las deformaciones positivas (acumulación de carga) del 11—*cis*—retinal fueron exploradas con el valor de contorno de 0,001 bohr⁻³ que es el nivel de deformación correspondiente al patrón de deslocalización característico encontrado en moléculas aromáticas¹⁸⁰. Este tipo de exploración fue usada para identificar sitios específicos de perturbación a lo largo del sistema π conjugado del retinal. Las perturbaciones de la nube π que resultan relevantes implican menos contribución a la deslocalización de la carga a partir de átomos del 11—*cis*—retinal en rodopsinas mutantes con respecto a las rodopsinas de referencia WT.

Fue seleccionado un sistema de ejes común para cada estructura con el fin de cuantificar la perturbación de la nube π conjugada. En este sistema de coordenadas, el eje z es perpendicular al plano definido por tres átomos consecutivos del retinal que incluye a los átomos del enlace donde tiene lugar la perturbación de la densidad electrónica. Se puede probar fácilmente que el primer término en la expansión multipolar del fragmento atómico, el cual contribuye de forma análoga (acumulando o reduciendo carga) tanto a la parte superior como a la inferior del sistema π del conjugado, es el componente $d_{3z^2-r^2}$ con $m = 0$ del cuadrupolo ($l = 2$) (Figura 4). Por lo tanto, el incremento de los valores del momento $d_{3z^2-r^2}$ del cuadrupolo significa mayor contribución a la

deslocalización de la carga a través de la nube π conjugada. El valor y el signo del momento son descriptores cuantitativos de la contribución de un átomo dado al componente π del retinal, lo cual puede ser útil para cuantificar perturbaciones en la deslocalización.

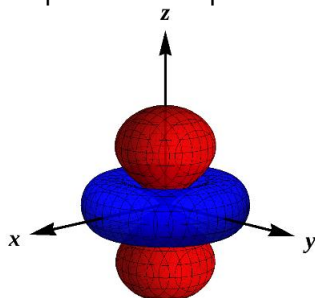


Figura 4. Armónico esférico $m = 0$, $l = 2$ (componente $d_{3z^2-r^2}$ del cuadrupolo), el cual permite identificar la adición de carga (en rojo) por encima y por debajo del plano xy (tres átomos consecutivos del retinal, los cuales son perpendiculares al eje z). La reducción de carga (en azul) está ubicada entre ambas regiones de acumulación (en rojo). La contribución del componente $m = 0$ ($l = 2$) describe cuantitativamente las nubes π conjugadas del retinal.

2.13. Cálculo del potencial de ionización

El teorema de Koopmans¹⁸¹ fue usado para analizar comparativamente propiedades redox entre las regiones QM de rodopsinas WT y mutantes. Así, la aproximación al potencial de ionización (PI_{aprox}) de la región QM es el negativo del valor de la energía correspondiente al orbital HOMO. Consecuentemente, los valores de PI_{aprox} fueron atribuidos al residuo de las rodopsinas calculadas sobre el cual están ubicados ambos orbitales frontera dentro de la región QM.

2.14. Modelos

En este estudio, se utilizaron los siguientes modelos QM/MM (Figuras A2—A8; Anexos):

- **Rho₁**: rodopsina en solvente explícito de agua, la región QM incluye a 11—*cis*—retinal, parte de los residuos aminoácidos Lys296 y Glu113, y dos moléculas de agua (W6 y W8) (Figuras 1 y 3), para los sistemas QM/MM: bWT, hWT, hM207R y hS186W (MD₁).
- **Rho₂**: el modelo **Rho₁** es modificado teniendo en cuenta que la región QM solamente contiene 11—*cis*—retinal y parte del residuo aminoácido Lys296. Todas las cargas puntuales MM

son ajustadas a cero, excepto aquellas del residuo aminoacídico Glu113, para los sistemas QM/MM: hWT, hM207R y hS186W (MD₁).

- **Rho₃**: rodopsina en bicapa lipídica solvatada de palmitoil—oleoil—fosfatidil—colina, la misma región QM como en **Rho₁**, para los sistemas QM/MM: bWT, hWT y hS186W (MD₂^L).
- **Rho₄**: usando el modelo **Rho₁** pero el residuo aminoacídico Glu113 (contraión) y las moléculas de agua fueron excluidas de la región QM, para los sistemas QM/MM: hWT, hM207R y hS186W (MD₁).
- **Rho₅**: usando el modelo **Rho₁** pero la región solamente contiene 11—*cis*—retinal y parte del residuo aminoacídico Lys296. Todas las cargas puntuales MM fueron retenidas excepto aquellas del residuo aminoacídico Glu113, para los sistemas QM/MM: hWT, hM207R y hS186W (MD₁).
- **Rho₆**: usando el modelo **Ret_{gas}** pero aplicado al sistema QM/MM: hS186W (MD₁).
- **Ret_{gas}**: en este modelo, la región QM solamente contiene 11—*cis*—retinal y parte del residuo aminoacídico Lys296. Todas las cargas puntuales MM son ajustadas a cero, para el sistema QM/MM: hWT (MD₁).

2.15. Análisis de los datos

Se mostraron los resultados como valores promedios con sus desviaciones estándares y porcentajes. Los parámetros, coeficientes de determinación (R^2) y la raíz cuadrática de la desviación promedio (*rmsd*) entre funciones, fueron evaluados usando el paquete Mathematica v.8.0¹⁸². Se utilizaron los programas VMD v.1.8.7¹⁵⁶ y gOpenMol v.3.0¹⁸³⁻¹⁸⁵ para las representaciones de estructuras moleculares e isosuperficies de las deformaciones de la densidad electrónica, respectivamente.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Evaluación estructural de las rodopsinas

Dentro de una esfera de radio 4,5 Å con centro en el retinal, se encontró una identidad de secuencia de 100 % y un RMSD de 0,5 Å entre los residuos aminoacídicos de las rodopsinas bovina (bWT) y humana (hWT) normales. Además, las moléculas de agua cercanas al cromóforo se ubicaron de forma coincidente en bWT y hWT. Por lo tanto, los sitios de unión del retinal de ambas estructuras WT son muy similares (Figura A9; Anexos). La similitud estructural entre los sistemas bovino y humano normales, así como, la información bioquímica disponible para estas rodopsinas, especialmente para la bovina, proporcionan un punto de referencia apropiado para evaluar la calidad y consistencia de los resultados.

3.1.1. Evaluación de la calidad de las estructuras tridimensionales de las rodopsinas

Los valores de los parámetros de calidad obtenidos indican que las estructuras 3D de las rodopsinas calculadas son adecuadas, siendo los indicadores muy similares a aquellos obtenidos para la estructura del cristal de partida 1U19 (Tabla 1). Se obtuvo una compatibilidad adecuada entre la ubicación de cada residuo en la secuencia y su ambiente 3D, teniendo en cuenta el puntaje 3D—1D; así como, una mejor calidad de empaquetamiento con puntajes Z más positivos (calidad de empaquetamiento de segunda generación) para todas las estructuras generadas por homología respecto a la estructura 1U19. Por otro lado, las rodopsinas computadas exhibieron un valor cercano al 90 % para las regiones más favorecidas en el mapa de Ramachandran, siendo este valor superior con respecto a la cadena B del cristal 1U19, aún cuando esta estructura de partida fue resuelta a 2,2 Å. Los modelos por homología y el cristal de rodopsina bovina resultaron ser estructuras usuales, considerando que se obtuvo un valor del factor G general mayor que -0,5.

Por otro lado, los valores de RMSD calculados entre las estructuras de homología y la cristalina resultaron ser bajos, mostrando similitud entre las estructuras 3D calculadas y el cristal.

Tabla 1. Validación estructural de las rodopsinas calculadas por homología.

Criterio	Parámetro	1U19	bWT	hWT	hM207R	hS186W
PROCHECK*	Más favorecidas ^(a)	78,5	87,5	88,8	87,8	86,5
	Permitidas adicionales ^(a)	16,2	9,2	9,2	8,2	9,9
	Permitidas generosamente ^(a)	3,6	2,3	1,0	2,6	2,6
	No permitidas ^(a)	1,7	1,0	1,0	1,3	1,0
	Factor G general	> -0,5	> -0,5	> -0,5	> -0,5	> -0,5
WHAT_CHECK (Valor Z)	Calidad de empaquetamiento (segunda generación)	-1,1	-0,5	-0,4	-0,4	-0,6
Verify-3D						
Valor 3D-1D*	(≥ 0,2)	72,4	82,2	75,3	68,7	73,3
	(≥ 0,1)	88,5	90,8	89,1	88,2	92,2
Cálculo del RMSD ^(b)	RMSD	—	1,1	1,2	1,2	1,3

* Expresado en porcentaje (%).

^(a) Regiones en el mapa de Ramachandran (90,0 % es el umbral en las regiones más favorecidas para una resolución de 2,0 Å).

^(b) RMSD del eje peptídico calculado vs cristal 1U19, usando VMD.

Probablemente, el sistema bWT resuelto equivale a una mejor estructura con respecto a la de partida; siendo entonces adecuada la metodología usada para las rodopsinas humanas hWT, hM207R y hS186W con unas secuencias de residuos aminoacídicos muy similares a aquella de bWT. Tanto el núcleo proteínico que incluye al SR como el puente disulfuro Cys110—Cys187 fueron conservados en el caso de todos los sistemas analizados. La evaluación realizada mues-

tra la alta calidad de las estructuras 3D construidas en este estudio, obteniéndose de forma apropiada la rodopsina humana y sus mutantes, no disponibles experimentalmente (Tabla 1). Estas estructuras son mejoradas aún más por el método QM/MM.

3.1.2. Similitud entre los sitios de unión del retinal

Las geometrías del SR son básicamente las mismas en las cuatro estructuras para una rodopsina dada (bWT, hWT, hM207R o hS186W) del modelo **Rho**₁ (Figura 5). Las conformaciones obtenidas a partir de las trayectorias de la dinámica molecular MD₂^R mostraron un SR muy similar a aquellos de las conformaciones seleccionadas a partir de las trayectorias de MD₁ y luego optimizadas por el método híbrido QM/MM (**Rho**₁) (Figura 6).

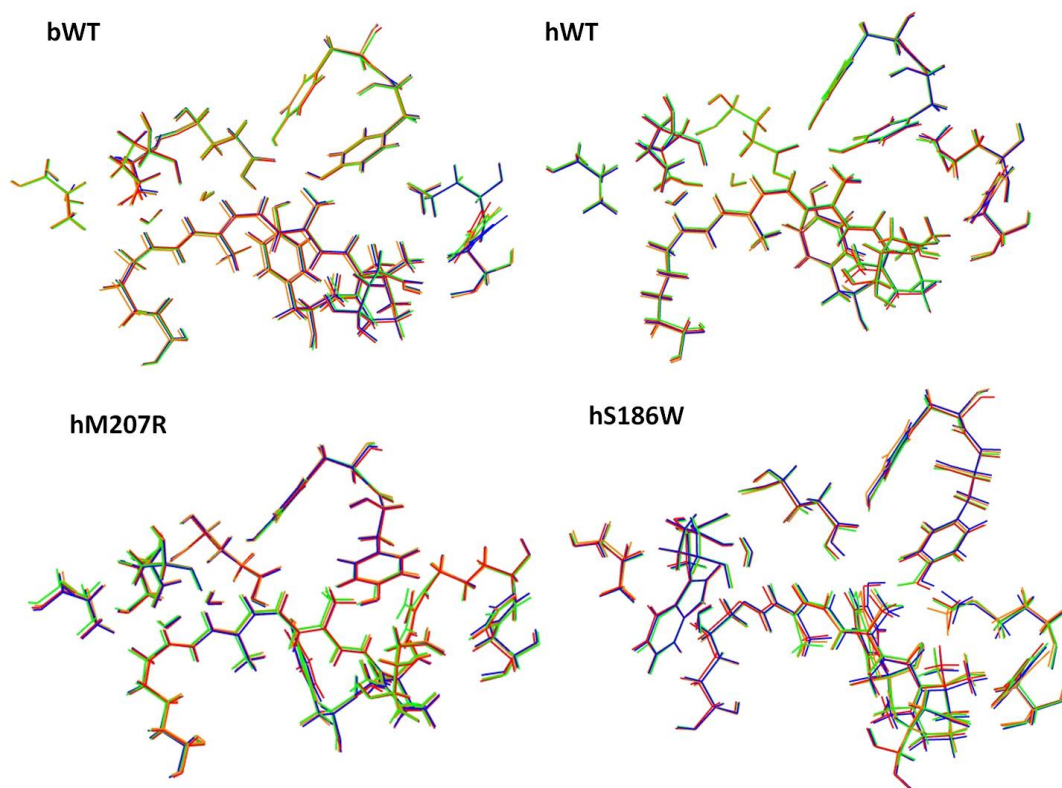


Figura 5. Superposición de los sitios de unión del retinal pertenecientes a las cuatro estructuras (un color para cada estructura) obtenidas por la simulación MD₁ y optimizadas al nivel QM/MM (modelo **Rho**₁) para cada sistema WT (parte superior) y mutante (parte inferior).

Los valores de energía y RMSD a lo largo de las dinámicas MD₂^R y MD₁ presentaron muy poca variación, alcanzándose un adecuado equilibrio energético y geométrico (Figuras A10a, A10c, A11a y A11c; Anexos), por lo que las conformaciones generadas a partir de estas simulaciones para proseguir con los modelos **Rho**₁, **Rho**₂, **Rho**₄, **Rho**₅, **Rho**₆ y **Ret**_{gas} no son artefactos.

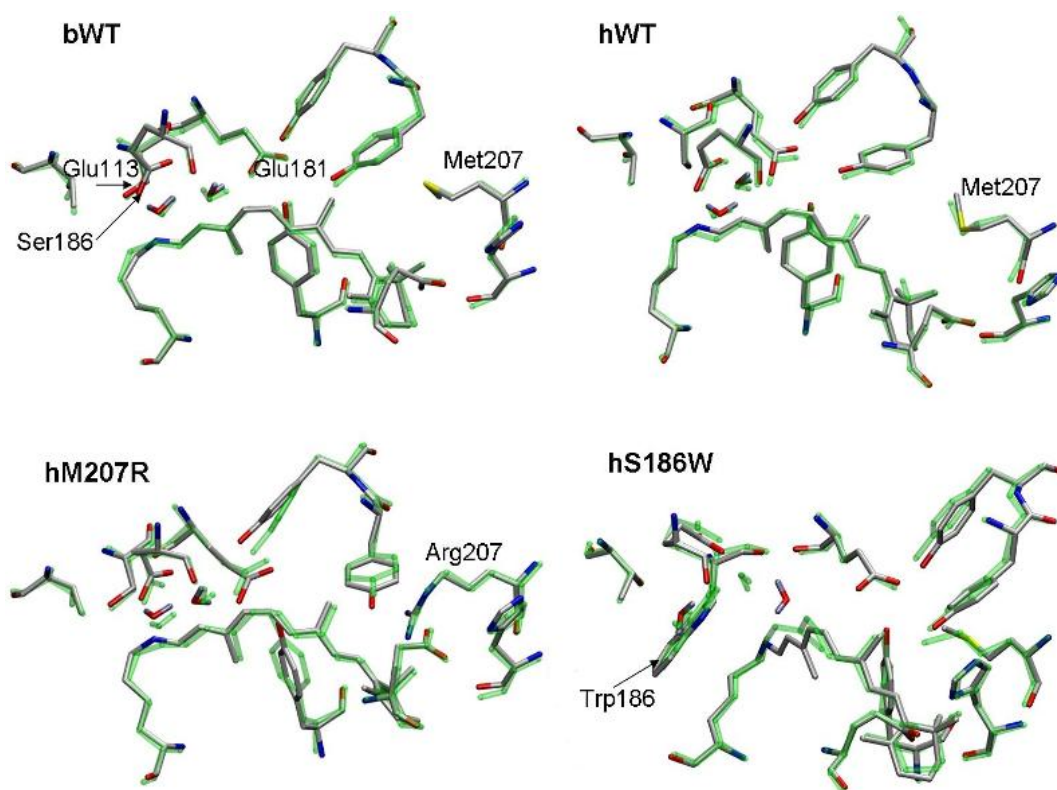


Figura 6. Superposición entre el sitio de unión del retinal de una estructura del modelo **Rho**₁ para cada sistema WT (parte superior) y mutante (parte inferior) con otra (representada en verde) de la simulación MD₂^R. Los átomos de hidrógeno no son visualizados.

Por otro lado, aunque el equilibrio energético fue también alcanzado durante las simulaciones MD₂^L (Figura A10b; Anexos), los valores del RMSD exhiben desviaciones geométricas después de un nanosegundo y al final de la simulación (tres ns) como puede verse en la Figura A11b (Anexos). Con el fin de enriquecer el universo conformacional de sistemas con BSP y BSD, así como, incrementar el conjunto de datos para las propiedades geométricas y espectrales se forza-

ron estas desviaciones conformacionales significativas en las rodopsinas del modelo **Rho₃**, con respecto a las estructuras de partida.

Se han reportado desviaciones estructurales en la proteína durante simulaciones prolongadas de la rodopsina insertada en membrana¹⁸⁶. Probablemente, uno de los cambios más interesantes alcanzados durante la simulación MD₂^L es que en el sistema bWT, el grupo carboxílico del residuo aminoácido Glu181 se movió lejos del retinal (Figura A12; Anexos) para adoptar una posición no encontrada durante las simulaciones MD₁ y MD₂^R (Figura 6). Las propiedades geométricas y espectrales exploradas en las conformaciones desviadas y seleccionadas a partir del espacio conformacional generado por la dinámica MD₂^L fueron calculadas después de ser estas estructuras optimizadas mediante el método combinado QM/MM (modelo **Rho₃**).

3.1.3. Análisis de estabilidad

Las sustituciones aminoácidas M207R y S186W afectaron la estabilidad del SR en las rodopsinas mutantes como es de esperar dada la naturaleza química de estos cambios (Figura 7).

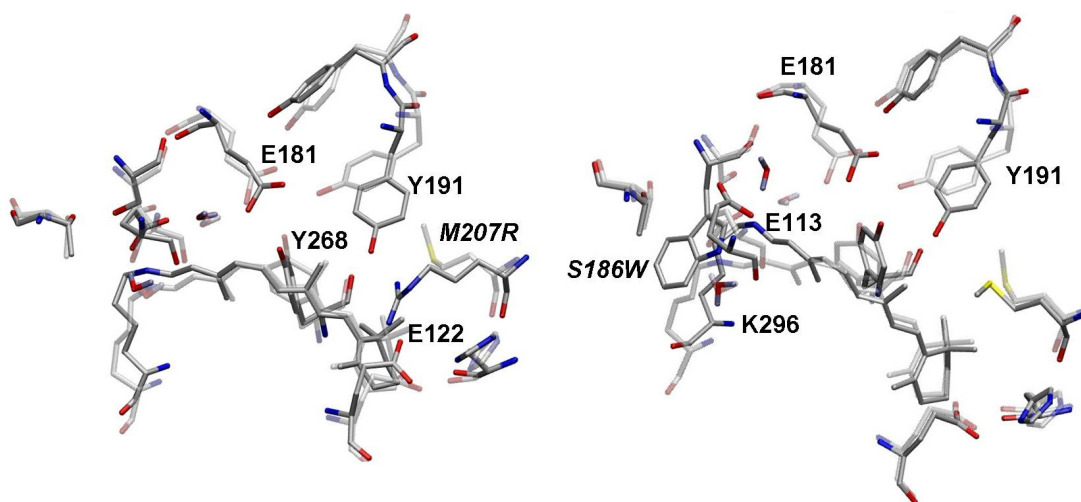


Figura 7. Sustituciones aminoácidas en el sitio de unión del retinal en las rodopsinas mutantes hM207R (izquierda) y hS186W (derecha). Se muestra transparente el SR para rodopsina normal hWT. Los átomos de hidrógeno (excepto los de las moléculas de agua) fueron omitidos y se resaltan los residuos importantes. Los sitios provienen de estructuras optimizadas al nivel QM/MM.

En la estructura de la rodopsina, la sustitución aminoacídica M207R lleva al cambio del residuo aminoacídico metionina, M207, (apolar) por arginina (Arg207), este último es más voluminoso y polar iónico cargado positivamente; la sustitución S186W ocasiona el cambio del residuo serina, S186, (polar) por triptófano (Trp186), mucho más voluminoso y aromático (Figuras 1 y 7).

Se calcularon las energías mediante MM de la región formada por: 11-*cis*-retinal, base de Schiff, dos moléculas de agua (W6 y W8), Lys296, Glu113, Glu181, Tyr191, Tyr192, Tyr268 y Thr94 para el mismo número de átomos entre todos los sistemas (182 átomos) durante las simulaciones de las rodopsinas en membrana (MD₂^R y MD₂^L). Comparativamente, los valores de energía de este SR más extenso fueron ligeramente superiores y muy superiores para los mutantes hM207R y hS186W, respectivamente, con respecto a la rodopsina hWT.

El incremento de la energía en el núcleo proteínico de las rodopsinas mutantes es mantenido prácticamente de forma sistemática durante toda la trayectoria de cada simulación, sea MD₂^R (Figuras 8a y A13[Anexos]) o MD₂^L (Figuras 8b y A14[Anexos]). Esto es válido aun cuando en el caso de esta última simulación buscamos desviaciones estructurales significativas en los sistemas analizados. Si bien es evidente que las energías MM totales son superiores para el mutante hS186W en esa región estructural, no se observan grandes diferencias para hM207R a través de estos resultados con respecto a hWT (Figura 8). No obstante, se realizaron cálculos QM/MM adicionales para el sistema hM207R que permiten identificar valores de energía más elevados en su núcleo proteínico con respecto a hWT. En hM207R, el incremento del valor de energía QM fue de 6,5 kcal/mol para la región QM (nivel de teoría: B3LYP/TZVP) y de 29,5 kcal/mol para un SR más extenso (B3LYP/SVP) que incluye a la región QM más los residuos aminoacídicos Glu181, Tyr268 y Thr94. Además, los promedios de valores de energía registrados en la etapa final de las dinámicas moleculares clásicas MD₂^R y MD₂^L (Tabla A1; Anexos) muestran el mismo comporta-

miento para las diferencias energéticas entre cada mutante y hWT (*vide supra*). Estos hallazgos muestran que el núcleo proteínico en los mutantes hM207R y hS186W es menos estable con respecto a aquel de la rodopsina humana normal.

Los valores de energías MM que se muestran en la Figura 8 son computados para una región que abarca los átomos de la región tratada con QM y los residuos más significativos implicados en la red de puentes de hidrógeno del SR. Lo anterior permite una aproximación al efecto desestabilizador de las sustituciones M207R y S186W en la estructura de la rodopsina dentro de la membrana. El grado de inestabilidad en mutantes, basado en estas diferencias de energía calculadas para el SR en hM207R y hS186W con respecto a hWT (Figuras 8, A13 y A14 [Anexos]), es coherente con los resultados de un estudio previo reciente donde se usó algoritmo FoldX²⁷ pero sin explorar causas de inestabilidad a nivel atómico.

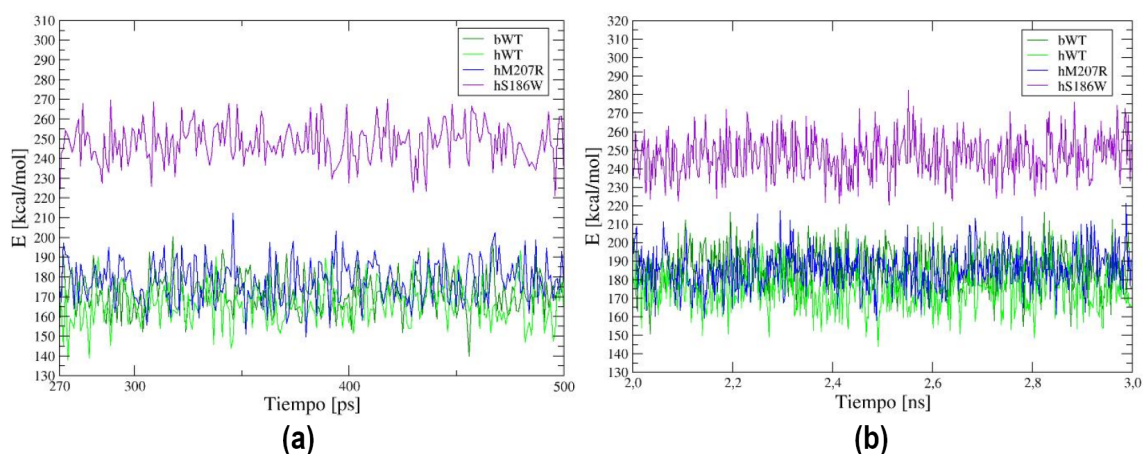


Figura 8. Energías MM totales (E) del núcleo proteínico constituido por: Glu113, Lys296, 11-*cis*-retinal, W6, W8, Glu181, Tyr191, Tyr192, Tyr268 y Thr94; a) simulación MD₂^R; y b) MD₂^L (último nanosegundo). bWT (verde oscuro); hWT (verde claro); hM207R (azul) y hS186W (violeta).

Por lo tanto, se analizaron propiedades estructurales relacionadas con la estabilidad para explicar las diferencias de energías encontradas entre los sitios de unión del retinal de las rodopsinas normales y ambos mutantes. Consecuentemente, la red de puentes de hidrógeno alrededor del cromóforo 11-*cis*-retinal está perturbada en los dos mutantes con respecto a las rodopsinas

WT (Tabla 2; Figura 9). En las rodopsinas del modelo **Rho₁**, la sustitución M207R conduce a un acercamiento de los residuos aminoácidos Glu113, Ser186, y Thr94 (comparado con hWT), desestabiliza las interacciones por puentes de hidrógeno del residuo Glu181 con Tyr191 y Tyr192, y lleva a una elongación de las distancias O_{Tyr268}—O_{Tyr191} y O_{Ser186}—O_{W6} (Tabla 2). La sustitución S186W causa cambios sobre la red de puentes de hidrógeno que resultan en la pérdida de las interacciones entre los residuos aminoácidos Glu113 y Lys296; en adición, Glu113 y Thr94 son separados entre sí (comparado con hWT), y la red de puentes de hidrógeno entre Glu181, W6, y Tyr191 es también afectada en este sistema (Tabla 2).

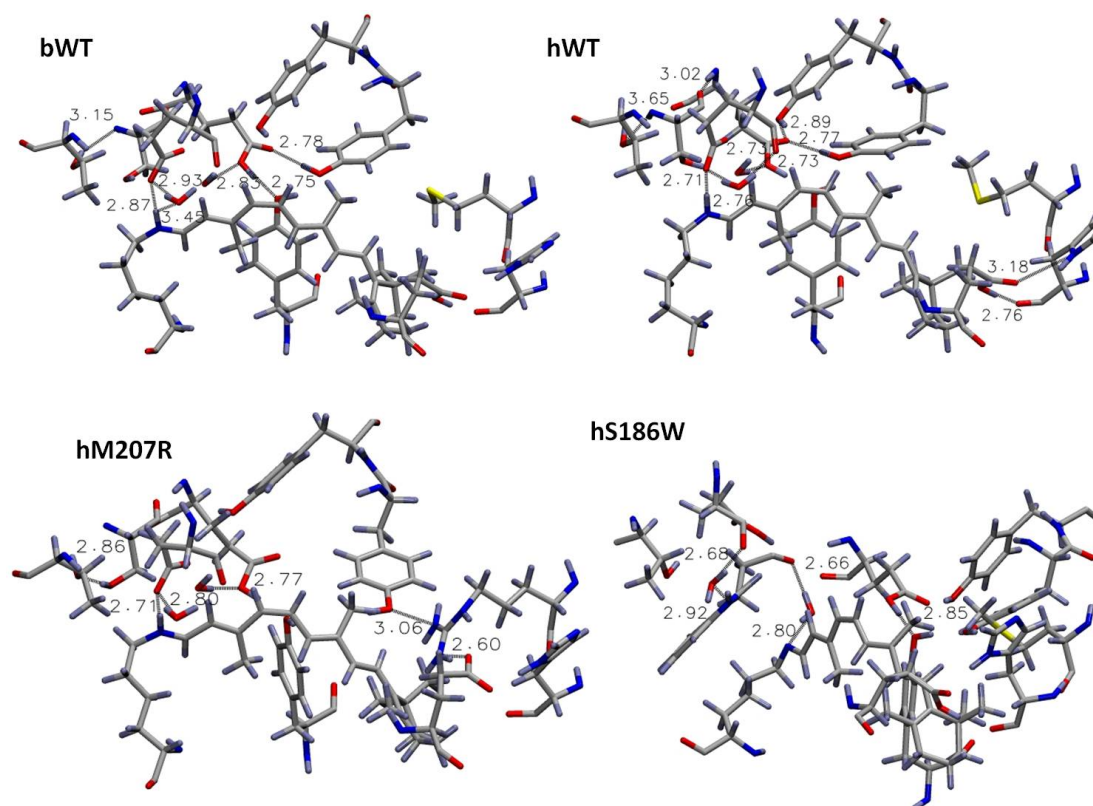


Figura 9. Red de puentes de hidrógeno del sitio de unión del retinal (SR) en rodopsinas WT (parte superior) y mutantes (parte inferior). Los SR provienen de estructuras optimizadas por el método QM/MM. Las distancias entre átomos pesados son expresadas en angstroms.

Los efectos más significativos sobre el puente salino entre el contraión y la base de Schiff, y en la red de puentes de hidrógeno del SR tienen lugar en el sistema hS186W. La estructura obtenida

para este mutante mostró el mayor grado de inestabilidad (incremento de energía en el SR) y perturbación de las interacciones por puentes de hidrógeno en el núcleo proteínico (Figuras 8 y 9; Tabla 2).

Tabla 2. Distancias promedio de puentes de hidrógeno (para átomos pesados y expresadas en angstroms) entre residuos del sitio de unión del retinal en rodopsinas QM/MM optimizadas. Se muestran las desviaciones típicas.

Distancias	QM/MM (Modelo Rho ₁)		
	hWT	hM207R	hS186W
OE2 _{Glu113} —NZ _{Lys296}	2,71 ± 0,01	2,73 ± 0,02	6,61 ± 0,07
OE1 _{Glu113} —NZ _{Lys296}	3,76 ± 0,05	3,50 ± 0,03	6,64 ± 0,10
OE2 _{Glu113} —OW8	2,76 ± 0,00	2,81 ± 0,02	3,86 ± 0,12
OE2 _{Glu113} —OG _{Ser186}	5,42 ± 0,03	4,28 ± 0,05	—
OE2 _{Glu113} —OG1 _{Thr94}	4,50 ± 0,05	3,96 ± 0,06	6,29 ± 0,09
OE2 _{Glu181} —OW6	2,74 ± 0,01	2,77 ± 0,01	4,26 ± 0,08
OE2 _{Glu181} —OH _{Tyr268}	2,78 ± 0,02	2,80 ± 0,02	2,90 ± 0,05
OE1 _{Glu181} —OH _{Tyr192}	2,89 ± 0,01	4,86 ± 0,06	2,68 ± 0,02
OE1 _{Glu181} —OH _{Tyr191}	2,78 ± 0,02	5,80 ± 0,13	5,00 ± 0,25
OH _{Tyr268} —OH _{Tyr191}	2,90 ± 0,05	4,70 ± 0,12	2,91 ± 0,06
OG _{Ser186} —OG1 _{Thr94}	4,95 ± 0,03	2,85 ± 0,01	—
OG _{Ser186} —OW6	2,76 ± 0,00	4,21 ± 0,04	—

La red de puentes de hidrógeno en el SR es muy importante para estabilizar térmicamente a la rodopsina y tiene implicaciones en la reacción de fotoisomerización³⁹. Por lo tanto, su perturbación en los mutantes hM207R y hS186W podría disminuir la estabilidad de estas rodopsinas. Además, tales desviaciones estructurales probablemente no solo son la contribución más importante a la inestabilidad de los mutantes sino también pueden afectar el proceso de fotoisomerización en estos sistemas asociados a RP.

La estabilidad calculada como función del pH para los modelos de homología coincidió con los resultados anteriores mostrados (Figuras 8, 9 y 10; Tabla 2), y con otros reportados para el comportamiento del plegamiento en estas rodopsinas²⁷. Los valores de estabilidad como función del

pH para la rodopsina mutante hM207R fueron cercanos a los de su contraparte humana no mutante (hWT) pero a la vez el sistema hM207R apareció ligeramente menos estable de forma sistemática, y el mutante hS186W mostró la mayor pérdida de estabilidad en el rango de pH desde 5 a 11,5 (incluye al rango fisiológico). Este comportamiento de la estabilidad para los modelos de ambos mutantes es consistente con las consecuencias estructurales y energéticas en el SR causadas por las sustituciones M207R y S186W (*vide supra*). Estos hallazgos podrían ser útiles al valorar propuestas recientes para influir en el plegamiento y la unión del retinal que tendrían lugar en estos sistemas de forma natural o artificial, usando para esta última variante moléculas estabilizadoras de proteínas^{27-29,187,188}.

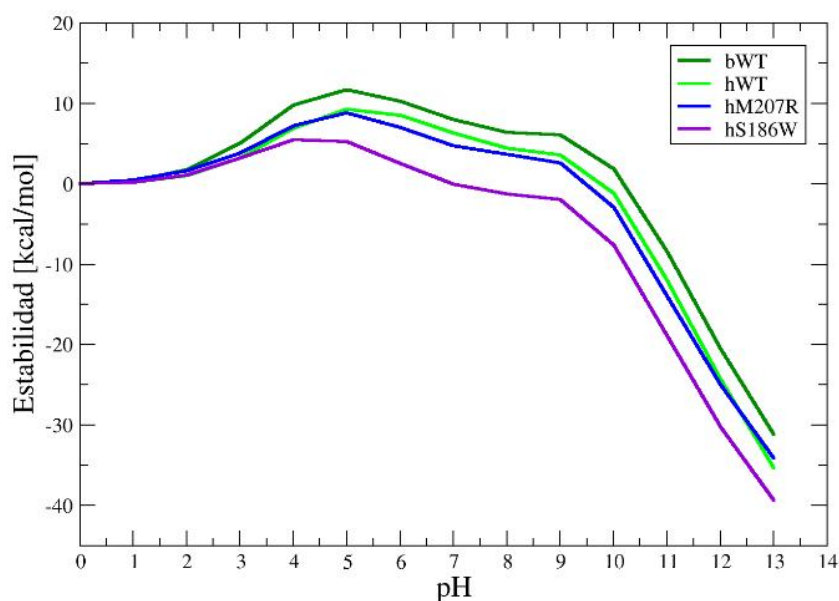


Figura 10. Estabilidad, como función del pH, para estructuras calculadas por homología. bWT (verde oscuro), hWT (verde claro), hM207R (azul), y hS186W (violeta).

Se asume que las estructuras de rodopsinas obtenidas a partir de la simulación MD₂^R presentan las conformaciones más cercanas a la realidad dentro de la membrana (su ambiente natural). Las propiedades espectrales, entre otras, de las estructuras optimizadas por MM en membrana y generadas por las simulaciones MD₂^R pueden ser inferidas a partir de las estructuras QM/MM

(MD₁) debido a la alta similitud entre sus sitios de unión del retinal (Figura 6). Los siguientes análisis geométricos, electrónicos y espectrales se realizaron sobre las estructuras seleccionadas del espacio conformacional generado por la simulación MD₁ y subsecuentemente optimizadas por el método combinado QM/MM (modelo **Rho**₁).

3.1.4. Evaluación del enlace C₁₁=C₁₂

El ángulo diedro C₁₀—C₁₁=C₁₂—C₁₃ (ϕ C₁₀—C₁₁=C₁₂—C₁₃) caracteriza la estructura del retinal en el enlace C₁₁=C₁₂ (doble enlace). La conformación de la cadena polieno del retinal a nivel del enlace C₁₁=C₁₂ fue 11—*cis* para todas las estructuras. Las rodopsinas WT (bWT y hWT) mostraron un valor del ϕ C₁₀—C₁₁=C₁₂—C₁₃ de -12,0 grados (°), los cuales se corresponden con los valores -11,0°¹⁸⁹, -17,0° y -16,0°⁹⁸ reportados por anteriores estudios teóricos para el estado no excitado de rodopsinas bovinas. Un estudio QM/MM reciente sobre la rodopsina del calamar también encuentra que un pre—torcimiento (-17,0°) es requerido para la fotoisomerización del enlace C₁₁=C₁₂¹⁹⁰. Aunque con una diferencia ligera con respecto a las rodopsinas normales, los valores del ϕ C₁₀—C₁₁=C₁₂—C₁₃ fueron sistemáticamente menores (alrededor del valor -9,0°) e indican una conformación menos pre—torcida a nivel del enlace C₁₁=C₁₂ del retinal en los mutantes hM207R y hS186W (Tabla 3).

Aparentemente, el ambiente de la proteína en las rodopsinas WT ejerce una tensión estérica mayor sobre la mitad del 11—*cis*—retinal y por tanto fuerza un poco más la torsión en torno al doble enlace C₁₁=C₁₂, en el cual ocurre la fotoisomerización. Por el mismo motivo, se podría esperar que esta reacción de fotoisomerización sea menos facilitada en ambos mutantes. Tales efectos ambientales son importantes porque la estructura electrónica del retinal no es selectiva para la rotación de los enlaces dobles en la cadena de polieno¹⁹¹, por lo que el ambiente de la proteína es decisivo específicamente para la isomerización en el enlace C₁₁=C₁₂. No obstante,

las consecuencias energéticas de ligeras variaciones en el ángulo diedro $\varphi_{C_{10}-C_{11}=C_{12}-C_{13}}$ son pequeñas: variando este ángulo aproximadamente $5,0^\circ$ (hacia $-7,5^\circ$ en hWT y alrededor de $14,5^\circ$ en hM207R y hS186W) y realizando optimizaciones QM/MM constreñidas con este ángulo fijo, se alcanzan cambios en las energías relativas menores que 2,5 kJ/mol. Por consiguiente, la menor torsión en los mutantes impone solamente una penalización energética mínima a la reacción de fotoisomerización.

Tabla 3. Valores promedio correspondientes a $\varphi_{C_{10}-C_{11}=C_{12}-C_{13}}$ (en grados) y alternancia de longitud de enlace (en angstroms) del 11-*cis*-retinal en el estado no excitado de las rodopsinas WT y mutantes. Se muestran las desviaciones típicas.

Estructura	$\varphi_{C_{10}-C_{11}=C_{12}-C_{13}}^{(a)}$	ALE
bWT	$-12,0 \pm 0,7$	$0,42 \pm 0,00$
hWT	$-12,2 \pm 0,5$	$0,43 \pm 0,01$
hM207R	$-9,2 \pm 0,7$	$0,50 \pm 0,01$
hS186W	$-8,6 \pm 1,2$	$0,56 \pm 0,02$

^(a)En el cristal (1U19), el valor¹⁵ de $\varphi_{C_{10}-C_{11}=C_{12}-C_{13}}$ es: $-36,1^\circ$.

3.1.5. Torsión y planaridad del anillo β -ionona del retinal

La orientación del anillo β -ionona es 6-*s-cis* en el enlace C_6-C_7 del cromóforo 11-*cis*-retinal. Los valores promedios calculados del ángulo diedro $\varphi_{C_5=C_6-C_7-C_8}$ son $-48,1 \pm 1,5^\circ$ (bWT), $-43,4 \pm 1,4^\circ$ (hWT), $-36,9 \pm 1,5^\circ$ (hM207R), y $-44,6 \pm 3,9^\circ$ (hS186W). Los valores encontrados para este ángulo diedro en las estructuras 3D del modelo **Rho**₁ están en adecuada correspondencia con el valor experimental reportado para la cadena B en el cristal 1U19 ($-31,9^\circ$)¹⁵ y con resultados obtenidos de cálculos previos ONIOM-EE (B3LYP/6-31G*:AMBER) ($-44,0^\circ$)¹⁸⁹, de simulaciones MD clásicas ($-52,0^\circ$), y dinámicas moleculares combinadas con el método QM/MM ($-42,0^\circ$)⁹⁸. La conformación 6-*s-cis* ha sido encontrada por

todos los estudios de difracción de rayos X para la rodopsina bovina¹⁵, siendo la conformación energéticamente preferida en esta proteína¹⁸. Otro parámetro geométrico importante es el ángulo diedro $\varphi_{C_4-C_5=C_6-C_7}$ del anillo β -ionona, el cual está relacionado con su planaridad. Los valores computados para este ángulo de $178,7 \pm 0,7^\circ$ (bWT), $177,4 \pm 0,4^\circ$ (hWT), $-178,9 \pm 0,3^\circ$ (hM207R), y $177,0 \pm 0,7^\circ$ (hS186W) concuerdan con el grado de planaridad encontrado para la estructura cristalina ($170,6^\circ$)¹⁵ en esa región del cromóforo; aunque son más cercanos a 180° y por tanto indican que cada sistema calculado es ligeramente más planar en dicho sitio estructural del retinal.

3.1.6. Evaluación de la alternancia de longitud de enlace

Las variaciones en la alternancia de longitud de enlace simple/doble en la cadena poliénica, activa ante la luz visible, del 11-*cis*-retinal asociado a la rodopsina han sido relacionadas con el ajuste espectral ocasionado por el ambiente de la proteína^{18,31}. Los valores de ALE para la rodopsina bovina están bien documentados^{15,18,98} y en acuerdo total con los resultados obtenidos en este trabajo para el sistema bWT (Tabla 3; Figura 11). En general, los valores promedios de ALE para los mutantes hM207R ($0,50 \text{ \AA}$) y hS186W ($0,56 \text{ \AA}$) son mayores que aquellos para los sistemas WT ($0,42\text{--}0,43 \text{ \AA}$) como se puede observar en la Tabla 3. Las diferencias entre valores de ALE han sido previamente relacionadas con diferencias en la estructura electrónica^{15,18,98}. En retinales con los más altos valores de ALE, el orbital HOMO tiende a ser más localizado en la región del anillo β -ionona¹⁸. La ALE está también influenciada por el efecto electrostático del contraión Glu113, y este correlaciona con el momento dipolo del estado no excitado del retinal⁹⁸, las energías verticales de excitación (EVE)¹⁸, y la carga positiva a lo largo de la cadena polieno. Mientras mayor es la carga positiva, se hace también mayor la ALE¹³. Por lo tanto, el incremento de los valores de ALE en los mutantes hM207R y hS186W ($0,08$ y $0,14 \text{ \AA}$, respectivamente) indi-

ca menos deslocalización de la densidad electrónica en la cadena conjugada (Tabla 3; Figura 11) y es consistente con los corrimientos hipsocrómicos de EVE encontrados en ambos casos como se describe más adelante.

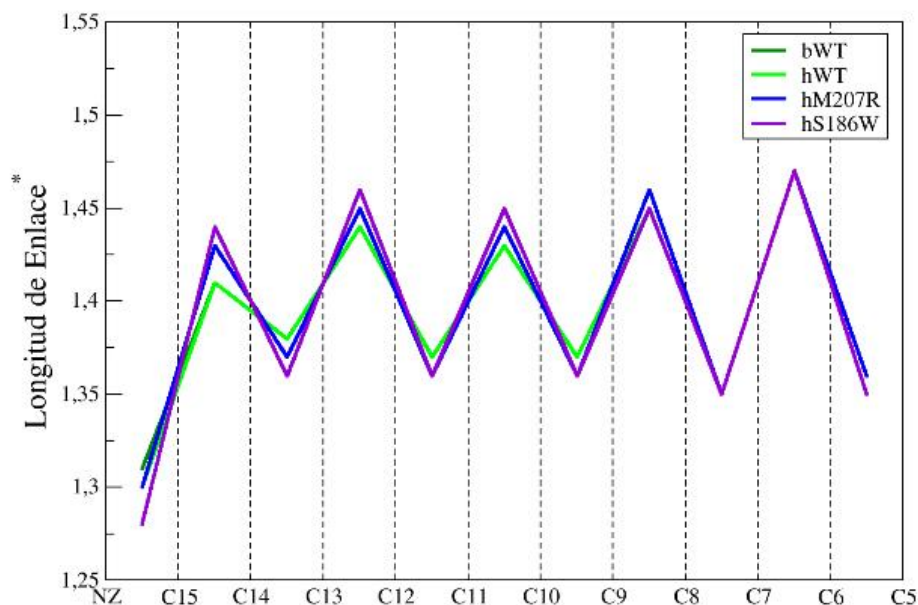


Figura 11. Alternancia de longitud de enlace (por enlace) en el estado no excitado de las rodopsinas WT y mutantes (ver Figuras 1 y 3 para notación atómica). bWT (verde oscuro), hWT (verde claro), hM207R (azul), y hS186W (violeta). *Las longitudes de enlace son dadas en angstroms.

Algunos estudios QM/MM recientes^{190,192} muestran desviaciones significativas entre los valores de ALE encontrados en el calamar y la rodopsina bovina que correlacionan con el cambio espectral mayor hacia el azul (hipsocrómico) encontrado en ambos sistemas. En los casos analizados aquí, los cambios en los valores de ALE son menores y, consecuentemente, los cambios hacia al azul de la energía vertical de excitación son menos pronunciados. Existen similitudes interesantes entre los patrones de ALE en nuestro trabajo y en la rodopsina del calamar. El pico más alto en nuestro esquema de ALE para el sistema hWT (Figura 11) corresponde al enlace C₆—C₇ (aproximadamente 1,47 Å), y el más bajo al enlace C₁₄—C₁₅ (cerca de 1,41 Å), en completa analogía con el análisis de ALE para la rodopsina del calamar con valores de 1,47 y 1,40 Å para los enlaces C₆—C₇ y C₁₄—C₁₅, respectivamente¹⁹⁰. Estas similitudes (con respecto a los enlaces

C₆–C₇, C₁₄–C₁₅, al ϕ C₁₀–C₁₁=C₁₂–C₁₃, y a ALE) entre sistemas animales tan diferentes en lo demás deberían ser tomadas en cuenta en estudios futuros sobre los mecanismos de ajuste espectral de rodopsinas de vertebrados e invertebrados. El comportamiento de los valores de ALE en los mutantes fue diferente al encontrado en los sistemas normales, lo cual sugiere cambios de la distribución de carga en los retinales de los sistemas hM207R y hS186W.

3.2. Análisis de las distribuciones de carga

En el mutante hM207R, es razonable que la densidad electrónica a lo largo de la cadena del cromóforo cambie por la introducción e influencia de una carga positiva cerca del anillo β –ionona del retinal debido al desplazamiento de Met207 por Arg207 (Figura 12).

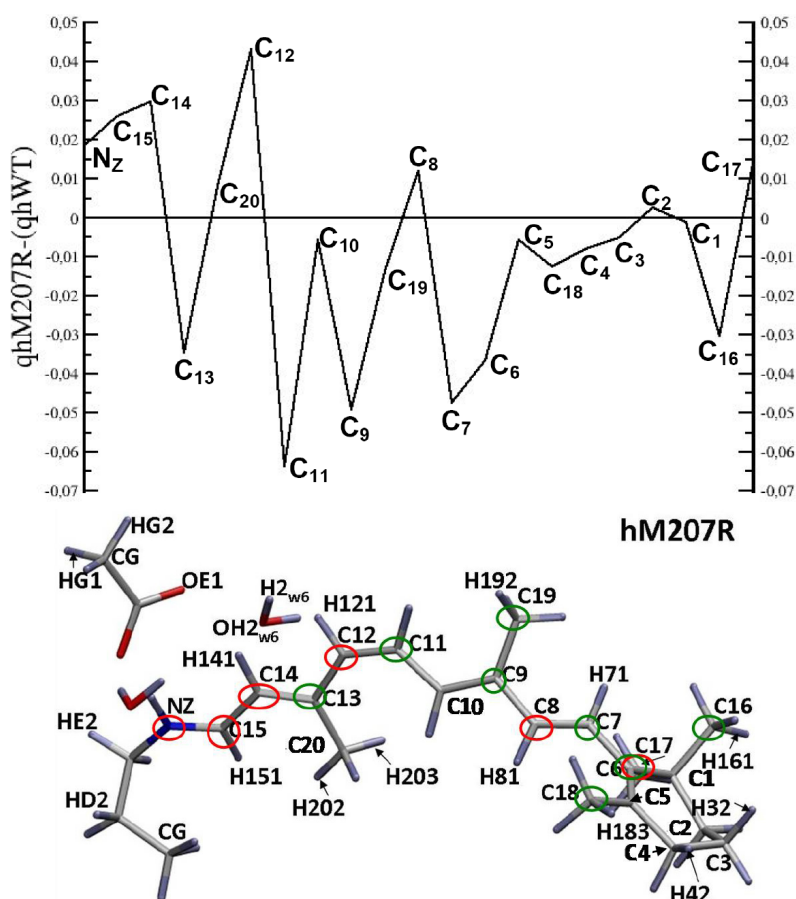


Figura 12. Parte superior: diferencias de cargas NBO entre hM207R y hWT (que exceden 0,01 e en valor absoluto). Parte inferior: notación atómica, marcas en rojo (verde) indican disminución (incremento) de la densidad electrónica.

Las densidades electrónicas son más bajas sobre los átomos C₁₂, C₁₄, C₁₅, C₁₇ y N_z del cromóforo, y más elevadas sobre los átomos C₆, C₇, C₉, C₁₁, C₁₃, C₁₆, C₁₈ y C₁₉ en este mutante con respecto a hWT (Figura 12). Por otro lado, también se encuentran diferencias entre el sistema hWT y hS186W (Figura 13).

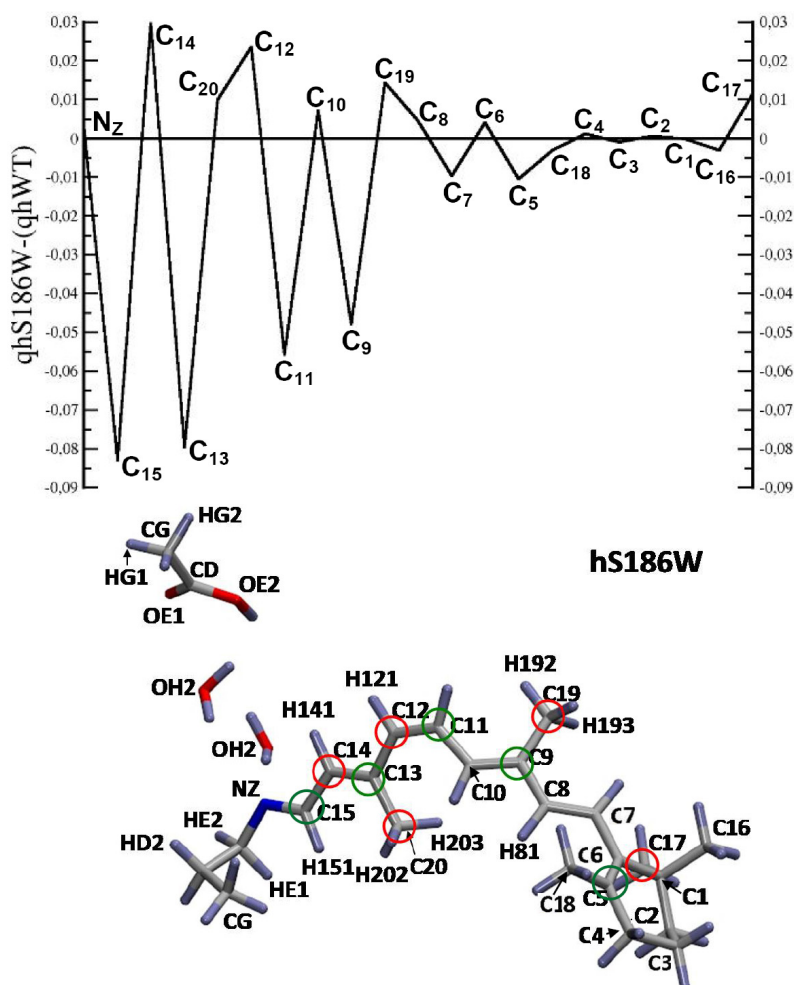


Figura 13. Parte superior: diferencias de cargas NBO entre hS186W y hWT (que exceden 0,01 e en valor absoluto). Parte inferior: notación atómica, marcas en rojo (verde) indican disminución (incremento) de la densidad electrónica.

En este mutante, la densidad electrónica sobre el átomo C₁₅ podría no afectarse por la no protonación de la base de Schiff y la ausencia de cambios significativos de las cargas NBO para el átomo N_z cercano. Sin embargo, la densidad electrónica del átomo C₁₅ aumenta en este mutante, tal comportamiento de la densidad electrónica está influenciado no solo por el estado de protona-

ción de la BS sino también por factores electrostáticos y estéricos dentro de la complejidad del ambiente proteínico. La densidad electrónica, explorada a través de cargas NBO, está también incrementada en el retinal de hS186W sobre los átomos C₅, C₉, C₁₁ y C₁₃ y es más baja sobre los átomos C₁₂, C₁₄, C₁₇, C₁₉ y C₂₀. Dado que no ocurren interacciones de residuos cargados con el anillo ionona como en el caso del mutante hM207R, la densidad electrónica no se afecta sobre los átomos de carbono C₁₆ y C₁₈ en hS186W (Figuras 12 y 13). A partir de la forma de los orbitales frontera (Figura 14), es obvio el sentido de transferencia completa de carga durante la excitación, si la interpretamos como predominantemente HOMO—LUMO en estas rodopsinas, desde la región del anillo ionona (C₅—C₁₀) hacia la región de la base de Schiff (C₁₁—C₁₅) del polieno del retinal (Figura 3), es decir, hacia el residuo contraión Glu113 cargado negativamente.

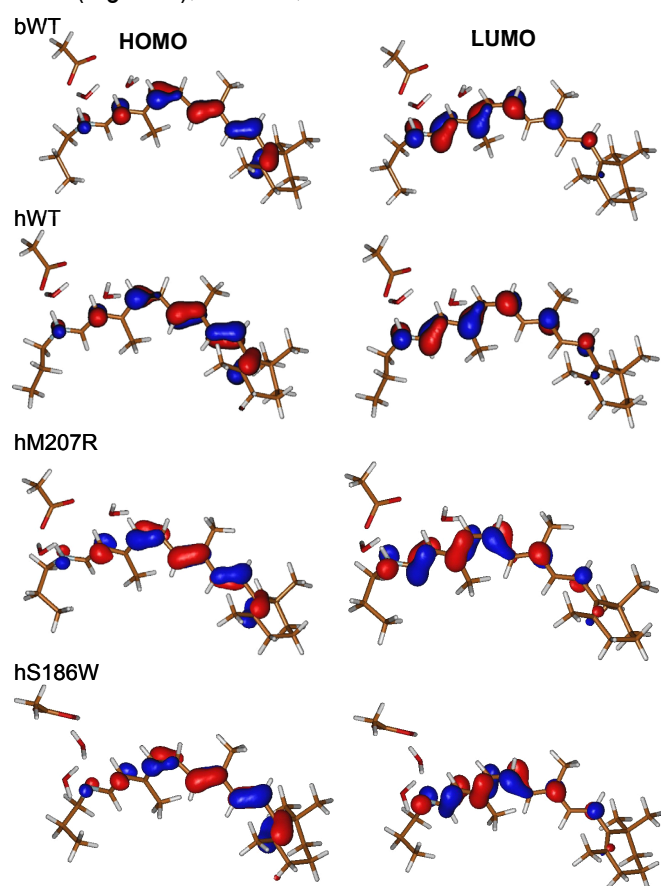


Figura 14. Orbitales HOMO y LUMO (nivel de teoría de DFT de Kohn—Sham: B3LYP/TZVP) de la región QM de estructuras QM/MM (modelo **Rho**₁).

En hM207R, la carga positiva del grupo guanidino de la Arg207 podría impedir esta transferencia de carga durante la excitación. Lo anterior está en correspondencia con un estudio del mutante E122Q de rodopsina bovina que reporta una disminución de la transferencia electrónica desde el grupo metilo unido al átomo de carbono C₁ del retinal al átomo de nitrógeno de su BSP, como una consecuencia de la reducción casi a la mitad de la carga negativa debido a la mutación¹⁸. En adición, aunque en **Rho**₁, el puente salino OE2_{Glu113}—NZ_{Lys296} tiene una distancia promedio similar en las estructuras hM207R y WT ($2,61 \pm 0,08$ Å), el átomo de oxígeno OE₁ del residuo Glu113 está más cerca del retinal (átomo N_z) en hM207R ($3,84 \pm 0,14$ Å vs $2,96 \pm 0,12$ Å para hWT y hM207R, respectivamente); la influencia del contraión tiende a estar implicada en la transferencia de carga del estado excitado^{31,62}. La región QM de la rodopsina mutante hS186W es menos polar porque contiene una base de Schiff neutral y un residuo Glu113 también neutro a una distancia relativamente grande (Figura 3; Tabla 2). En ausencia de una carga negativa y positiva sobre el residuo Glu113 y el residuo 207 (como en hM207R), respectivamente, podría no existir impedimento especial contra el cambio de carga una vez tenga lugar la excitación HOMO—LUMO.

3.3. Evaluación de las energías verticales de excitación

Se muestran las energías verticales de excitación y la fortaleza del oscilador por DFT/MRCI y TDDFT del primer estado excitado singlete (S_1) de la región QM para las cuatro estructuras de cada rodopsina del modelo **Rho**₁ (Tabla 4). Los valores medios calculados de EVE para S_1 de las rodopsinas WT, que son 2,49 eV para bWT y hWT con TDDFT, 2,56 eV para bWT y 2,50 eV para hWT con DFT/MRCI, reproducen muy bien los valores experimentales reportados para las rodopsinas bovina y humana que son 498 nm^{65,145} para la bovina, así como 493, 500 nm¹³⁰ y 495 nm¹²⁹ para la humana. Esto ocurre también con cálculos previos del espectro óptico de la rodopsina bovina^{18,31,62,189} lo que aporta confianza en la calidad de los modelos obtenidos.

Tabla 4. Las energías verticales de excitación promedio, EVE (en electronvoltios), de DFT/MRCI y TDDFT, longitudes de onda (en nanómetros; en paréntesis), y la fortaleza del oscilador (f) para las estructuras obtenidas de MD₁ (modelo **Rho**₁). Se muestran las desviaciones típicas.

Estructura	Exp.*	DFT/MRCI		TDDFT	
		EVE	f	EVE	f
bWT	2,49 (498) ¹⁴⁵	2,56 ± 0,03 (484 ± 6,73)	1,28 ± 0,02	2,49 ± 0,03 (497 ± 5,05)	0,63 ± 0,41
hWT		2,50 ± 0,05 (496 ± 9,83)	1,26 ± 0,02	2,49 ± 0,03 (498 ± 5,72)	1,05 ± 0,02
hM207R		2,93 ± 0,01 (424 ± 1,71)	1,22 ± 0,02	2,64 ± 0,06 (469 ± 10,88)	0,00 ± 0,00
hS186W		3,05 ± 0,03 (407 ± 3,11)	1,07 ± 0,07	2,79 ± 0,04 (445 ± 5,58)	0,82 ± 0,10

*Valor experimental para rodopsina bovina; los valores de 493, 495 y 500 nm para rodopsina humana normal se han obtenido en distintas condiciones experimentales^{129,130}.

En los dos mutantes, las energías de excitación calculadas con DFT/MRCI son aproximadamente 0,3 eV como promedio más elevadas que aquellas con TDDFT también mostradas aquí. Estas últimas son generalmente referidas como menos confiables. Por lo tanto, resulta conveniente discutir primariamente y a continuación los resultados del método DFT/MRCI.

Las primeras energías verticales de excitación (Tabla 4), incluyendo los diez estados excitados de menor energía (Figura 15), están desplazadas hipsocrómicamente en ambos mutantes (2,93 eV para hM207R y 3,05 eV para hS186W vs 2,50 eV en hWT) (Tabla 4 y Figura 15). A su vez, el incremento de las EVE en ambos mutantes indica también un exceso de energía de los fotones absorbidos en estos con respecto a los que se absorben por las rodopsinas normales WT, lo cual pudiera llevar al desbalance a favor de reacciones colaterales que son consideradas más adelante. Experimentalmente, el cambio hipsocrómico reportado (3,27 eV)²⁹ de la primera banda en una rodopsina portadora de la sustitución M207R es aún más fuerte que el computado. Se ha sugerido que este hecho indica la presencia de una BSD en este mutante²⁹, ya que la rodopsina WT

bovina también tiene una banda en 3,27 eV cuando la base de Schiff está desprotonada⁴². Por otro lado, un cambio espectral hacia el azul de la primera banda de absorción también puede ser causado por sustituciones aminoacídicas en el sitio de unión del retinal, en vez de por un cambio del estado de protonación de la base de Schiff.

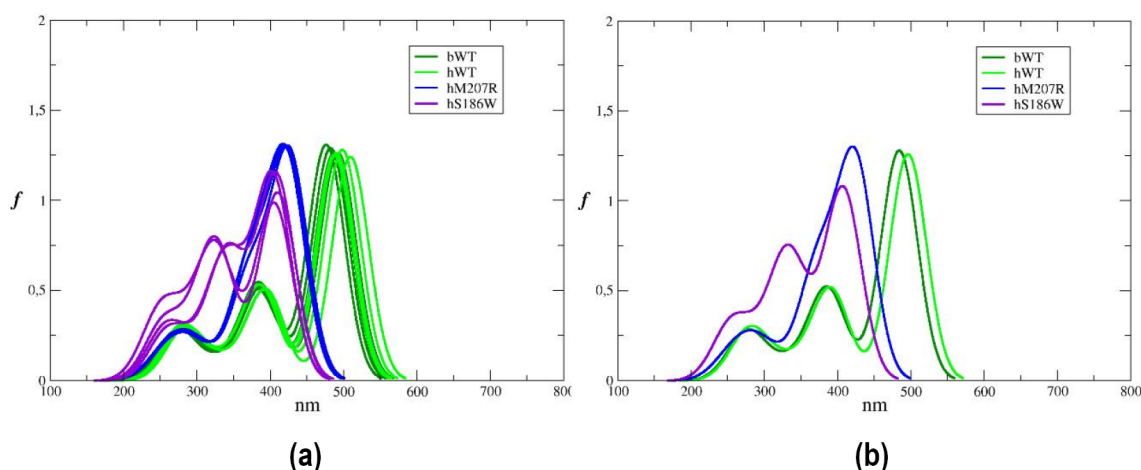


Figura 15. Longitudes de onda (nm) vs fortaleza del oscilador (f) de los cálculos DFT/MRCI; a) curvas para cada estructura; b) curvas promedio; a) y b) curvas calculadas (función tipo Gaussiana) para los 10 primeros estados excitados de las regiones QM en estructuras del modelo **Rho₁**. bWT (verde oscuro), hWT (verde claro), hM207R (azul), y hS186W (violeta).

Por ejemplo, de acuerdo con nuestros cálculos DFT/MRCI, tanto el mutante hS186W con BSD y el mutante hM207R con BSP mostraron comparables corrimientos hipsocrómicos (3,05 y 2,93 eV vs 2,50 eV en hWT). Por lo tanto, no existen razones para revisar nuestra asignación de estados de protonación sobre esta base; además los valores de pK_a^{BS} calculados son concordantes claramente con los de una base de Schiff protonada en el sistema hM207R (Tabla 5) que da lugar a un puente salino Glu113—BSP integro. Se ha discutido previamente que los grupos cargados negativamente en el SR de las rodopsinas WT pueden causar un cambio espectral significativo hacia el azul en las energías de excitación de S_1 a partir de una transferencia de carga asociada con una excitación HOMO—LUMO que debería sobrepasar el campo eléctrico del contraión³¹. Este efecto puede estar intensificado en el mutante hM207R debido al campo eléctrico más fuerte

del contraíón comparado con hWT: el cambio espectral hacia el azul de 0,43 eV puede ocurrir desde el punto de vista de la contribución de factores electrostáticos como una consecuencia de la polarización electrónica del grupo guanidino del residuo Arg207 y la fuerte influencia electrostática del residuo aniónico Glu113.

Tabla 5. Valores de pK_a^{BS} y pK_a^{Glu113} para estructuras obtenidas en diferentes etapas de los cálculos (ver notación).

hM207R	pK_a^{BS}	pK_a^{Glu113}
Modelo de homología	8,54	3,88
Modelo de homología optimizado	8,60	4,61
MD ₁	9,24	3,21
MD ₂ ^R (0,5 ns)	8,59	4,64
MD ₂ ^R (un ns)	9,24	3,21
MD ₂ ^L (tres ns)	9,33	3,35
Modelo QM/MM	8,68	4,46
Otros sistemas		
bWT (modelo de homología)	8,79	3,82
hWT (modelo de homología)	8,61	4,25
hS186W (modelo de homología)	5,88	8,31

La influencia del contraíón es mayor en hM207R que en las estructuras WT debido a que el Glu113 está más cerca de la BSP (*vide supra*). Por lo tanto, el estado S_1 es más desestabilizado en hM207R, lo cual resulta en una energía de excitación mayor. Un análisis similar sobre el efecto del contraíón Glu113 ha sido usado antes para explicar los cambios espectrales hacia el azul de la rodopsina bovina⁶². La influencia electrostática incrementada de Glu113 en hM207R es reflejada también en los valores de ALE calculados (Tabla 3). La dependencia directa de ALE y EVE con efectos electrostáticos es bien conocida⁷⁹. De acuerdo con nuestros cálculos DFT/MRCI en hWT, la transición $S_1 \leftarrow S_0$ ($\pi\pi^*$) es dominada por la excitación HOMO—LUMO (alrededor del 85,0 %). En los mutantes, esta excitación contribuye ligeramente menos (79,0 % en hM207R y 84 % en hS186W), y las excitaciones dobles llegan a ser más relevantes; además, los orbitales

HOMO-1 (π) y LUMO+1 (π^*) aparecen más implicados. Ambas mutaciones incrementan las diferencias de energía HOMO-LUMO y HOMO-LUMO+1 (Figura 16), lo cual se corresponde con el corrimiento hipsocrómico de las energías verticales de excitación con respecto a la rodopsina homóloga normal (hWT). Los altos valores calculados de energías verticales de excitación en ambos mutantes son consistentes con el incremento de ALE encontrado en estos con respecto a las estructuras WT (Tablas 3 y 4; Figura 15).

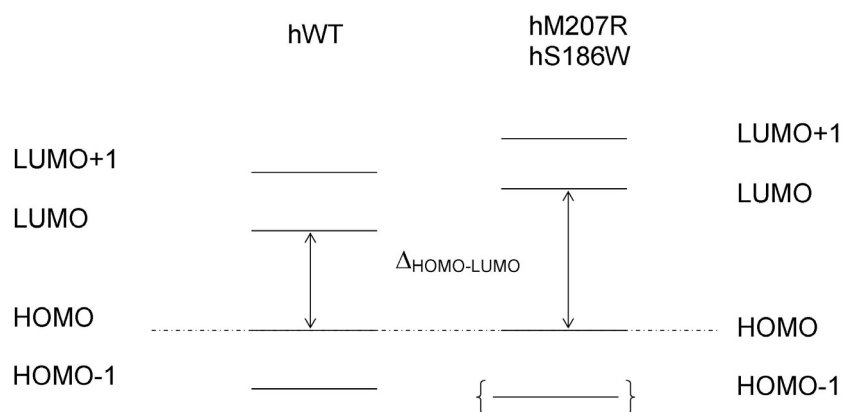


Figura 16. Representación esquemática de la variación de las diferencias de energías de orbitales con cada mutación para solo ilustrar que en mutantes existe mayor brecha energética entre los orbitales frontera. La energía del orbital HOMO es tomada como referencia en todos los casos. En comparación con hWT, la energía del orbital HOMO-1 es más baja en hS186W, y ligeramente más alta en hM207R.

Por lo tanto, el comportamiento espectral diferente que exhibe el retinal en los mutantes con respecto a las rodopsinas normales debe responder a los correspondientes cambios de la deslocalización de la carga en este cromóforo. Se necesita una descripción más exhaustiva y directa de la estructura electrónica de los retinales en estas rodopsinas que resuelva sus patrones de deslocalización. Lo anterior implica ir más allá de las aproximaciones clásicas e indirectas realizadas a través del análisis de cargas NBO y orbitales frontera. Como se menciona antes, la comprensión de la estructura electrónica del cromóforo en pigmentos visuales es crucial para explicar sus propiedades espectrales^{36,37}.

3.4. Análisis de la deslocalización de la carga del retinal a través de las deformaciones de la densidad electrónica. Descripción del sistema π conjugado del retinal

Las deformaciones de la densidad electrónica (DDE) fueron calculadas para cada región QM de las estructuras del modelo **Rho₁** portadoras de BSP (bWT, hWT y hM207R) o BSD (hS186W). En lo subsiguiente, el nivel de deformación positiva 0,001 bohr⁻³ fue usado para representar las isosuperficies de DDE, y la notación de todos los residuos en representaciones moleculares sigue como en el fichero *pdb* 1U19^{15,68}. En la Figura 17, se representan la estructura molecular de la región QM y las isosuperficies de la deformación positiva de la densidad electrónica que permiten describir el patrón de deslocalización del retinal en esa región para la rodopsina humana.

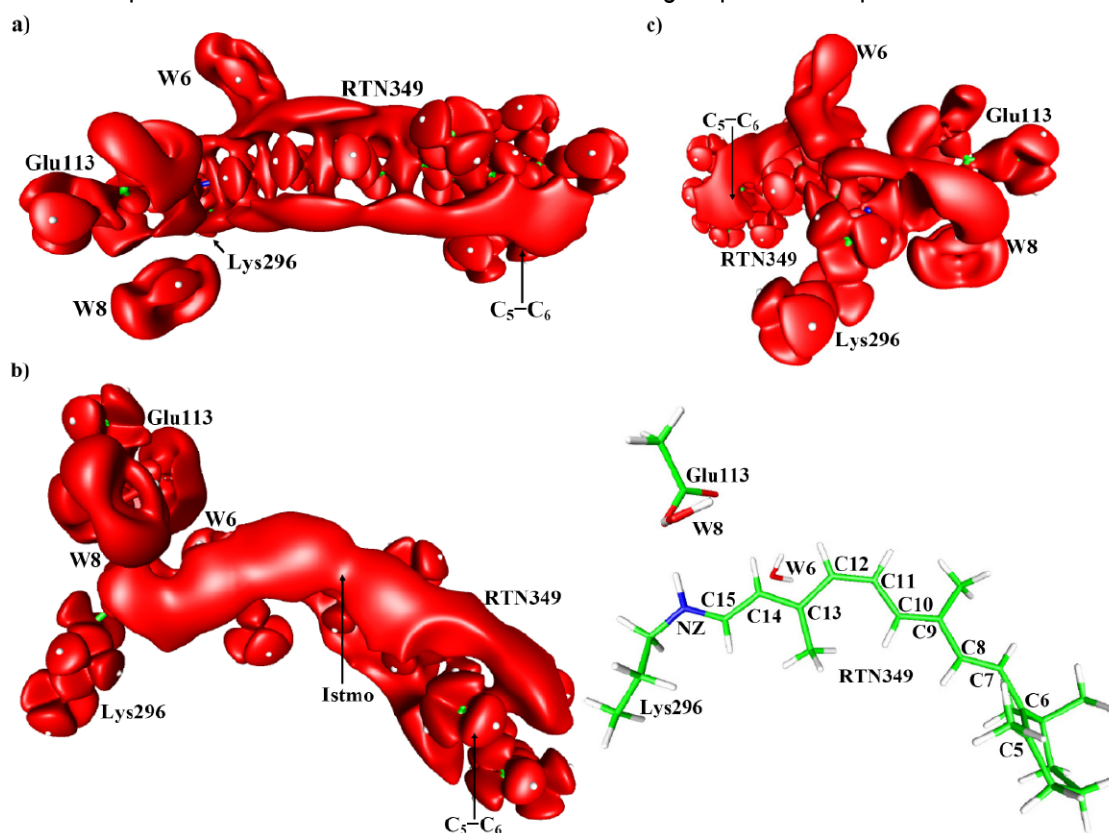


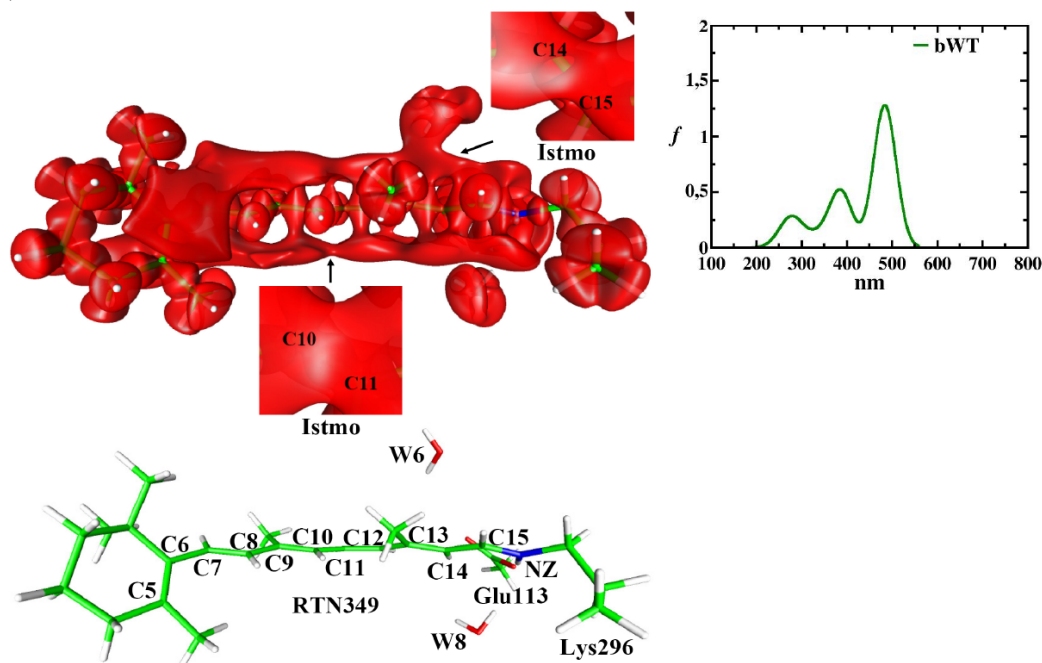
Figura 17. Isosuperficies de deformaciones positivas de la densidad electrónica (en rojo) para la región QM en hWT (modelo **Rho₁**): a) nótese la representación del sistema π conjugado del cromóforo 11-*cis*-retinal embebido en el ambiente de la rodopsina de referencia (hWT); b) istmo de la deformación de la densidad electrónica en la región central del retinal; c) densidad electrónica del residuo contraión Glu113 que estabiliza la base de Schiff protonada.

Se puede apreciar que las isosuperficies calculadas (Figura 17) reflejan perturbaciones en el sistema π conjugado del retinal, el cual es resuelto por primera vez en este trabajo. Se reporta que distorsiones geométricas en sitios específicos a lo largo de la cadena del retinal, debido a influencias estéricas o electrostáticas, podrían perturbar la deslocalización de la carga en el cromóforo^{31,81}. Tanto el enlace $C_5=C_6$ como la molécula de agua W6 aparecen implicados con el componente π conjugado del retinal en hWT (Figuras 17a y 17c). En la Figura 18, son mostradas el mismo tipo de isosuperficies usando el modelo **Rho**₁ para las rodopsinas bWT y hWT. El sistema π conjugado del 11-*cis*-retinal es continuo en las rodopsinas WT. A pesar de las distorsiones conformacionales conocidas del retinal en el ambiente del SR, ambos modelos mostraron el componente π conjugado como una cinta continua a lo largo de la cadena polieno del retinal desde el enlace $C_5=C_6$ hasta el átomo N_z de la base de Schiff (Figura 18). Es importante notar que el valor de contorno ($0,001 \text{ bohr}^{-3}$) usado para esta representación también permite mostrar las deformaciones de la densidad electrónica relacionada con cada enlace σ en la estructura. En este caso, las acumulaciones de densidad electrónica aparecen con simetría casi cilíndrica y son perfectamente distinguibles de las nubes π del sistema.

Se muestra un istmo de la densidad deformada que corresponde a un ligero estrechamiento de la nube π -conjugada en los enlaces $C_{10}-C_{11}$ y $C_{14}-C_{15}$ del retinal tanto de bWT como de hWT (Figuras 17b y 18). Los istmos significan una reducción de la acumulación de la carga en las regiones central y de la base de Schiff del 11-*cis*-retinal cuando se compara con el resto de la nube π . Se ha documentado que la región central está fuertemente torcida en el 11-*cis*-retinal de bWT con respecto al retinal al vacío¹⁹³ que muestra corrimiento hacia el rojo espectral de las EVE con respecto al retinal dentro de proteínas retinales¹⁹⁴⁻¹⁹⁶. La distorsión geométrica de la región central del retinal en rodopsina bovina (bWT) ha sido relacionada con la reacción de

fotoisomerización en el enlace $C_{11}=C_{12}^{21,189,191}$ y con la redistribución de la densidad electrónica para la transición electrónica $S_1 \leftarrow S_0^{66}$.

a) bWT



b) hWT

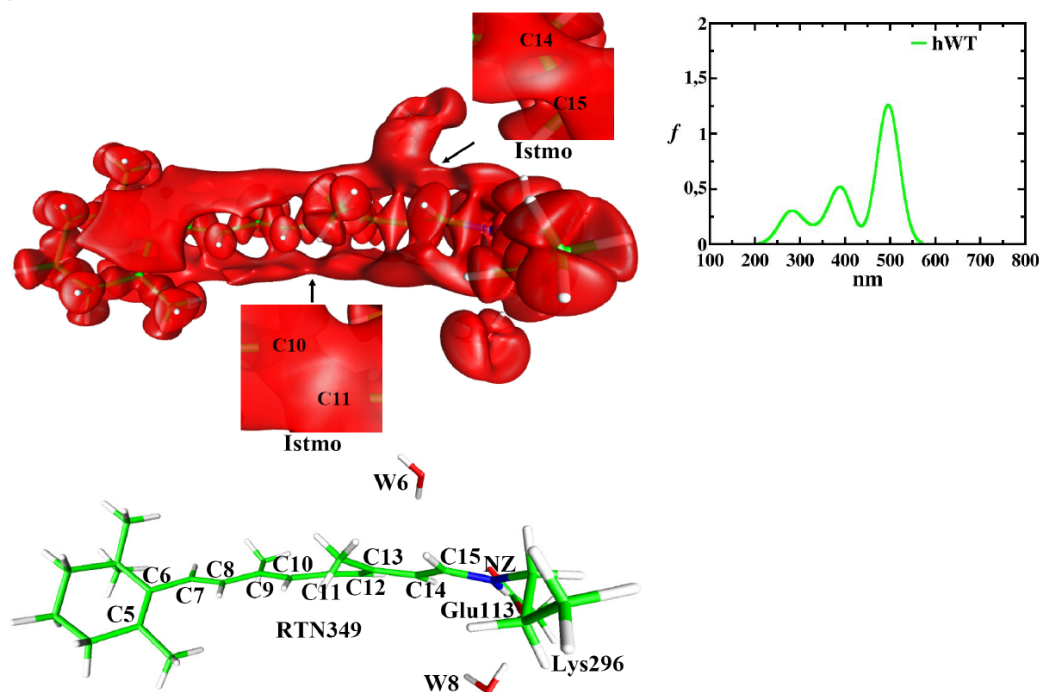


Figura 18. Isosuperficies de las deformaciones positivas de la densidad electrónica de las regiones QM (izquierda) y espectros UV-Vis (derecha) calculados de (a) bWT y (b) hWT; modelo **Rho**₁. El sistema electrónico π conjugado del 11-*cis*-retinal es continuo.

Un estudio previo sobre rodopsina bovina establece que las distorsiones del enlace simple $C_{14}-C_{15}$ podrían estar asociadas con la reducción de la conjugación electrónica (perturbación de la redistribución de la densidad electrónica)⁶⁶. Por otro lado, la base de Schiff protonada es estabilizada por la influencia electrostática de la densidad electrónica del contraión Glu113¹⁹⁷, la cual está significativamente implicada con la estructura electrónica del retinal; este hecho se hace notable a partir de las deformaciones computadas de la densidad (Figura 17c). El enlace $C_5=C_6$ aparece implicado dentro del sistema π conjugado al nivel de deformación computada en el 11-*cis*-retinal con la conformación 6-*s-cis*, como se describe antes. Aquí, nosotros encontramos que una nube π estaría más extendida que otra sobre ese doble enlace (Figuras 17b y 17c). Aunque, fue encontrado un cambio significativo de la ALE para ambos mutantes, sus distancias de enlace $C_5=C_6$ son similares a aquellas de los sistemas WT (1,35 Å para hWT, bWT y hS186W, y 1,36 Å para hM207R). Por lo tanto, se puede concluir que la distancia de este doble enlace es menos sensible a las variaciones de la estructura electrónica en cromóforos retinales.

Es posible también diferenciar las deformaciones de la densidad electrónica del 11-*cis*-retinal relacionadas con el átomo de oxígeno de las moléculas de agua. Ambos sistemas WT muestran que la molécula de agua W6 comparte densidad electrónica con el sistema π conjugado del cromóforo alrededor del átomo C_{14} del retinal (Figuras 17a y 18). Este hecho, es consistente con estudios que sugieren una influencia crucial de moléculas de agua internas sobre las propiedades espectrales de la rodopsina^{81,198} y con la proximidad encontrada aquí entre el retinal y la molécula de agua W6 (las distancias promedio entre los átomos C_{14} del retinal y oxígeno de W6 son $3,39 \pm 0,04$ Å y $3,57 \pm 0,02$ Å para hWT y bWT, respectivamente). De forma similar, se representan las deformaciones positivas de la densidad electrónica del 11-*cis*-retinal en los mutantes hM207R y hS186W (Figura 19).

a) hM207R

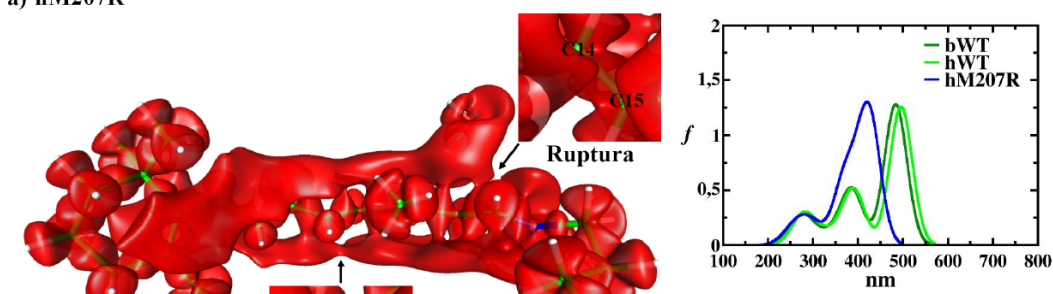


Figura 19. Isosuperficies de las deformaciones positivas de la densidad electrónica de las regiones QM (izquierda) y espectros UV—Vis (derecha) calculados de (a) hM207R y (b) hS186W; modelo **Rho**₁. El sistema electrónico π conjugado del 11—*cis*—retinal en ambos mutantes es discontinuo (a la izquierda). A la derecha, se observa el cambio espectral hacia el azul de la banda de absorción calculada previamente para cada mutante.

Cuando se comparan las isosuperficies de DDE calculadas en ambos mutantes con aquellas de las rodopsinas normales (Figuras 18 y 19), encontramos que la nube π de un lado del plano del cromóforo en hM207R está extendida como en los sistemas WT y un istmo más pronunciado aparece en torno al enlace simple $C_{10}-C_{11}$ del retinal. La isosuperficie de la densidad electrónica que representa al componente conjugado muestra una ruptura (discontinuidad) a nivel del enlace $C_{14}-C_{15}$ sobre el otro lado del plano del retinal (Figura 19a). Esta ruptura en torno al extremo de la base de Schiff revela una reducción tanto de la extensión de la nube π como obviamente de la deslocalización de la carga del retinal. Consecuentemente, las propiedades de excitación electrónica de este cromóforo tienen que ser cambiadas y la predicción concuerda con el cambio espectral hacia el azul para este mutante (hM207R) con respecto a los sistemas WT (*vide supra*). Adicionalmente, la distancia promedio $C_{14}-O_{W6}$ es $3,27 \pm 0,03 \text{ \AA}$ en el mutante hM207R, la cual es similar a aquellas en los sistemas hWT y bWT. La molécula de agua W6 está también implicada con la nube π de un lado del cromóforo (Figura 19a).

En el mutante hS186W, se observa la ruptura más extensa de la isosuperficie que representa a la nube π conjugada en la región central del retinal sobre un lado del plano del cromóforo donde consecuentemente tiene lugar la mayor reducción de la extensión de dicha nube (Figura 19b). El acortamiento del sistema π conjugado en términos de las isosuperficies calculadas explica el mayor corrimiento espectral hacia el azul de hS186W, siendo el cambio más relevante en las propiedades de excitación electrónica calculadas de los retinales dentro de las rodopsinas analizadas. Un istmo menos pronunciado persiste en el enlace $C_{14}-C_{15}$ con respecto a la rodopsina de referencia hWT (Figura 19b). Obviamente, la discontinuidad de la isosuperficie de la densidad electrónica deformada en el enlace $C_{10}-C_{11}$ aparece como la perturbación del componente π conjugado más significativa relacionada con las propiedades espectrales en el mutante hS186W.

Por otro lado, no se muestra interacción entre la molécula de agua W6 y las nubes π conjugadas del retinal en hS186W debido a sus conformaciones espaciales que llevan a las mayores distancias promedio C₁₄—O_{W6} ($4,10 \pm 0,05$ Å). Las deformaciones de la densidad electrónica del residuo aminoacídico Glu113 y de la base de Schiff no aparecen relacionadas entre sí (Figura 19b), como es de esperar, debido a sus estados de protonación y las distancias Glu113—base de Schiff que causan una ruptura del puente salino Glu113—BS (Tabla 2).

La cuantificación de la perturbación en la densidad electrónica deformada es alcanzada apropiadamente a través del componente $m = 0$ del cuadrupolo, el cual puede describir las contribuciones atómicas al sistema electrónico π conjugado en los enlaces C₁₀—C₁₁ y C₁₄—C₁₅. En la Tabla 6, se caracterizan los valores promedio del momento cuadrupolar $m = 0$ ($l = 2$) para el retinal de las rodopsinas del modelo **Rho**₁. Los valores de $m = 0$ ($l = 2$) para los átomos que corresponden al enlace C₁₀—C₁₁ en mutantes son más bajos que en ambas rodopsinas normales (WT). Este comportamiento concuerda con la descripción de la acumulación de carga calculada en la región central del retinal a partir de las isosuperficies de las deformaciones positivas de la densidad electrónica en rodopsinas WT y mutantes (Figuras 18 y 19). Además, la reducción de los valores del componente del cuadrupolo está en total correspondencia con la mayor torsión del ángulo diedro $\varphi_{C_9=C_{10}-C_{11}=C_{12}}$ encontrada cuando se va desde hWT hasta hM207R y hS186W (Tabla 6).

Los valores más bajos del momento multipolar ($m = 0$, $l = 2$) fueron encontrados para el 11—*cis*—retinal del sistema hS186W, el cual sufre la mayor torsión (aproximadamente 25° con respecto a los sistemas WT) en el enlace C₁₀—C₁₁ (Tabla 6). Consecuentemente, la distorsión geométrica en el enlace C₁₀—C₁₁ aparece como un factor relevante que afecta las contribuciones atómicas al sistema electrónico π conjugado del retinal en estas rodopsinas mutantes (hM207R y

hS186W) con respecto a hWT, en concordancia con el comportamiento de las isosuperficies calculadas para la densidad electrónica deformada (*vide supra*).

Tabla 6. Momento multipolar ($m = 0$, $l = 2$) promedio de los átomos implicados con las deformaciones de la densidad electrónica en los enlaces $C_{10}-C_{11}$ y $C_{14}-C_{15}$. Ángulos diedros (φ) para los enlaces relacionados con las perturbaciones electrónicas. Estos valores promedio corresponden al estado no excitado del retinal dentro de la región QM de estructuras del modelo **Rho₁** optimizadas a un nivel QM/MM. Los componentes del cuadrupolo están expresados en unidades atómicas (a.u.^x) y los ángulos en grados.

Estructura	C_{10} ($m = 0$, $l = 2$)	C_{11} ($m = 0$, $l = 2$)	$\varphi_{C_9=C_{10}-C_{11}=C_{12}}$
bWT	$1,273 \pm 0,030^{(a)}$	$0,922 \pm 0,050$	$170,5 \pm 1,4$
hWT	$1,401 \pm 0,044$	$1,077 \pm 0,027$	$170,8 \pm 0,8$
hM207R	$1,245 \pm 0,047$	$0,920 \pm 0,018$	$160,4 \pm 1,0$
hS186W	$0,440 \pm 0,163$	$0,762 \pm 0,083$	$145,1 \pm 6,9$
Estructura	C_{14} ($m = 0$, $l = 2$)	C_{15} ($m = 0$, $l = 2$)	$\varphi_{C_{13}=C_{14}-C_{15}=N}$
bWT	$1,723 \pm 0,017$	$0,624 \pm 0,022$	$175,6 \pm 0,5$
hWT	$1,617 \pm 0,024$	$0,670 \pm 0,013$	$173,3 \pm 0,2$
hM207R	$1,342 \pm 0,070$	$0,532 \pm 0,026$	$165,6 \pm 0,8$
hS186W	$1,786 \pm 0,176$	$0,947 \pm 0,038$	$176,1 \pm 3,9$

^(a) Media aritmética $\pm$ desviación típica.

La perturbación más significativa de la densidad electrónica se muestra en el enlace $C_{10}-C_{11}$ del retinal dentro de la rodopsina mutante hS186W. En este sistema, se calculó el corrimiento espectral hipsocrómico más intenso, de forma totalmente independiente (Tabla 4; Figura 15) de este modelo de cálculos (Tabla 6; Figuras 18 y 19). La Tabla 6 muestra los valores promedio del momento multipolar de los átomos C_{14} y C_{15} que exhiben la ausencia de perturbación de las nubes π en el enlace $C_{14}-C_{15}$ del 11-*cis*-retinal del mutante hS186W con respecto a los sistemas WT. Lo anterior está de acuerdo con la alta planaridad, y con el comportamiento de la isosuperficie de la densidad electrónica deformada en este simple enlace del retinal en hS186W (Figura 19b).

^x Del inglés **Atomic Unit**.

En contraposición, la región cercana al extremo de la base de Schiff del 11-*cis*-retinal está significativamente afectada en hM207R. Se encontró una reducción notable de las contribuciones atómicas a la deslocalización de la carga electrónica para los átomos C₁₄ y C₁₅ retinal. Estos hallazgos concuerdan con las representaciones de las nubes π conjugadas del cromóforo que muestran una ruptura de la densidad electrónica en el enlace C₁₄—C₁₅, una perturbación que es encontrada solamente en este mutante (Figuras 18 y 19). Además, el ángulo diedro $\varphi_{C_{13}=C_{14}-C_{15}=N}$ muestra un cambio de aproximadamente 10° en el mutante hM207R, comparado con los sistemas restantes. Al valor de contorno usado aquí (0,001 bohr⁻³), la pequeña extensión de la ruptura de la densidad electrónica en el enlace C₁₄—C₁₅ corresponde con el grado de torsión del retinal en este enlace simple (Tabla 6; Figura 19a). Tanto la discontinuidad de la densidad electrónica en el enlace C₁₄—C₁₅ como el istmo central más pronunciado explican la reducción de la extensión de la nube π conjugada del retinal en hM207R con respecto a las rodopsinas WT, y están de acuerdo con las propiedades espectrales calculadas de este mutante.

Por otro lado, los cálculos de las deformaciones de la densidad electrónica de las estructuras (región QM) de los modelos **Ret_{gas}** y **Rho₂** permiten una mejor comprensión sobre las causas de la perturbación del patrón de la deslocalización de la carga en retinales. Las representaciones usando el modelo **Ret_{gas}** para los cálculos DAM muestran al sistema π conjugado del 11-*cis*-retinal unido a parte del residuo aminoacídico Lys296 mediante la base de Schiff desprotonada (Figura 20). Se muestra un sistema π conjugado extensamente continuo y no perturbado a lo largo de la cadena poliénica del retinal mediante las isosuperficies calculadas en el modelo **Ret_{gas}**, similar a la descripción realizada para hWT (Figuras 17, 18b y 20). No obstante, los istmos de las deformaciones de la densidad electrónica del sistema 11-*cis*-retinal—BSD—Lys296 (**Ret_{gas}**) no son notorios en los enlaces simples C₁₀—C₁₁ y

C₁₄—C₁₅ del cromóforo 11-*cis*-retinal (Figura 20). Este sistema es la estructura más planar en las regiones central y de la base de Schiff; sus ángulos diedros $\varphi_{C_9=C_{10}-C_{11}=C_{12}}$ y $\varphi_{C_{13}=C_{14}-C_{15}=N}$ muestran valores de 178,0 y 180,0°, respectivamente.

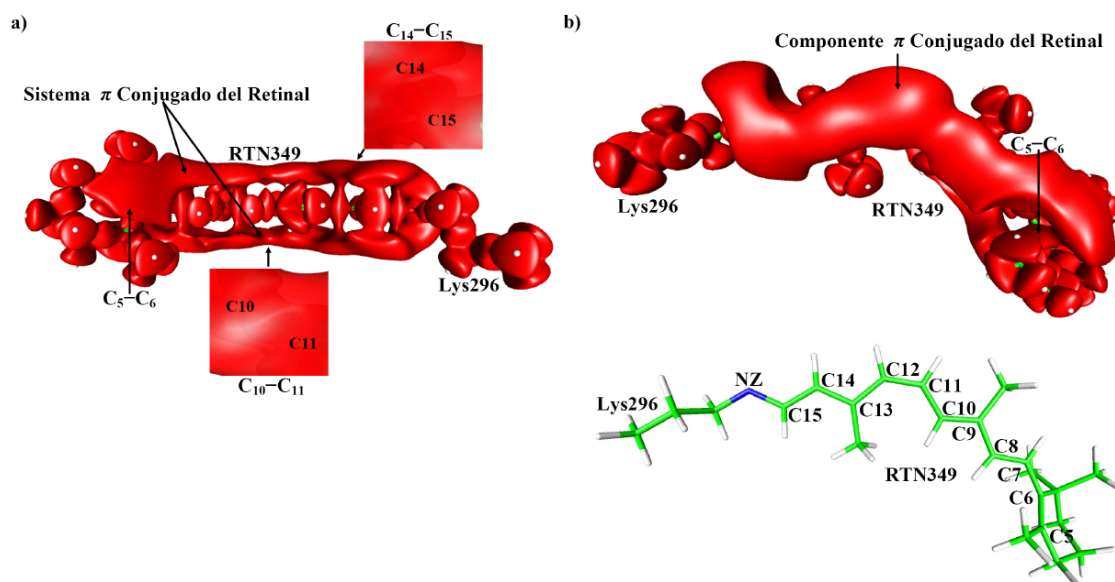


Figura 20. Isosuperficies de las deformaciones positivas de la densidad electrónica del sistema 11-*cis*-retinal-BSD-Lys296 y su representación estructural (modelo **Ret_{gas}**); se visualizan las isosuperficies en planos diferentes (a y b) del sistema π conjugado del retinal. La densidad electrónica no está perturbada en los enlaces simples C₁₀—C₁₁ y C₁₄—C₁₅.

En adición, nuestros cálculos exhiben para el sistema **Ret_{gas}** el valor más bajo de ALE (0,22 Å) y el estado singlete excitado de más baja energía (1,99 eV [622 nm]) en correspondencia con estudios experimentales y teóricos para el retinal en el vacío (610—635 nm)^{66,73,194-196}. Las isosuperficies de la deformación de la densidad electrónica usando el modelo **Rho₂** en hWT, hM207R y hS186W son muy similares a aquellas obtenidas a partir del modelo **Rho₁** (Figura 21). Sin embargo, el mutante hM207R (**Rho₂**) no exhibe la discontinuidad particular de la nube π en el enlace C₁₄—C₁₅ del retinal como en el modelo **Rho₁** (Figuras 19a y 21b). La ausencia de esta perturbación de la densidad electrónica alrededor de la base de Schiff está relacionada con un ángulo diedro $\varphi_{C_{13}=C_{14}-C_{15}=N}$ más planar (178,5°) en el mutante hM207R (**Rho₂**). Por supuesto, las

contribuciones de los átomos del retinal C_{14} (1,435 a.u.) y C_{15} (0,755 a.u.) a la deslocalización de la carga son mayores en hM207R de **Rho**₂ que en hM207R del modelo **Rho**₁ (Tabla 6). Aunque no existen perturbaciones de la densidad electrónica alrededor del enlace $C_{14}-C_{15}$ en las estructuras del modelo **Rho**₂, estas alteraciones persisten en las regiones centrales del retinal; aquí le prestamos especial atención a estas últimas. El istmo central de la deformación de la densidad electrónica permanece más pronunciado en el mutante hM207R que en hWT (Figuras 18b, 19a y 21b). Otra vez, la ruptura central extensa de la isosuperficie calculada corresponde al mutante hS186W (Figura 21c), aún cuando los efectos de polarización electrónica sobre el retinal debido a las sustituciones aminoacídicas no fueron considerados en este modelo (**Rho**₂).

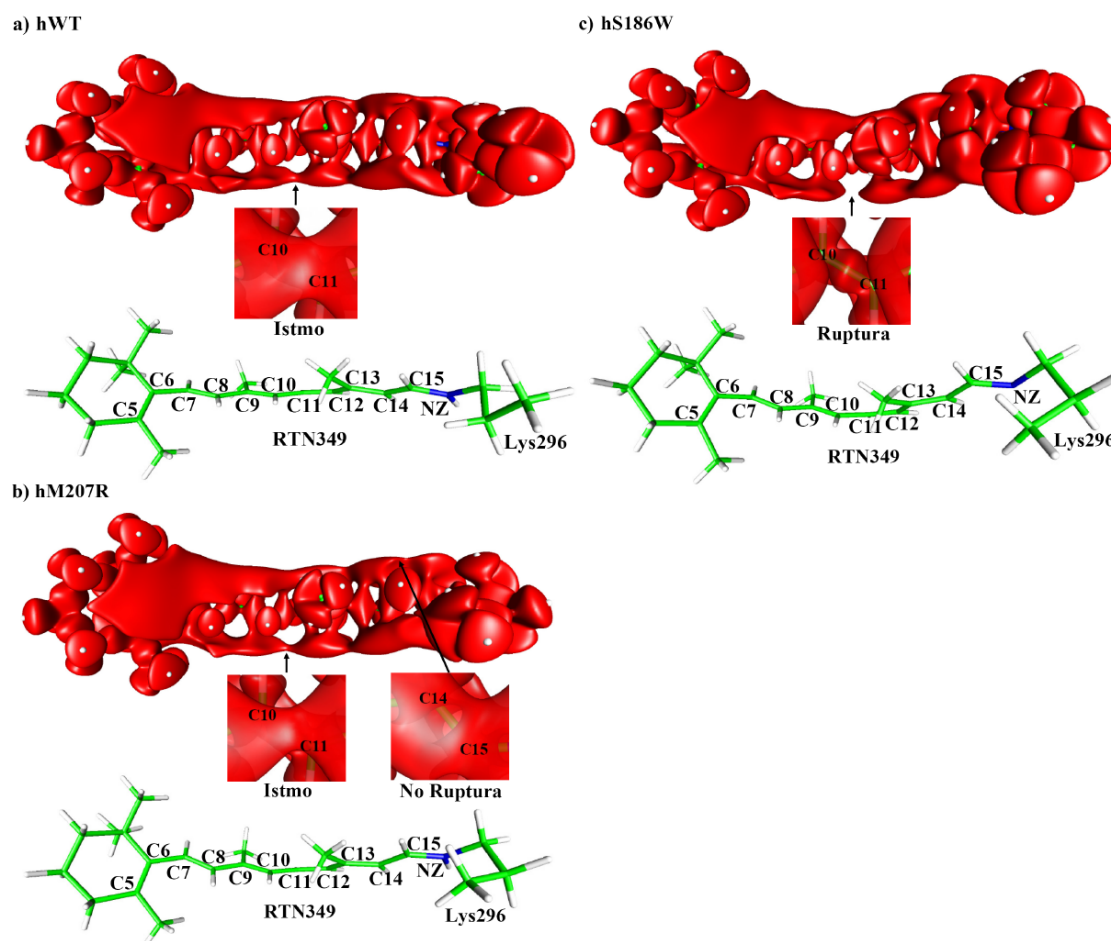


Figura 21. Isosuperficies de las deformaciones positivas de la densidad electrónica y representación estructural de la región QM en: a) hWT, b) hM207R y c) hS186W (modelo **Rho**₂).

En la Tabla 7 se muestran los momentos multipolares $m = 0$ ($l = 2$) de los átomos retinales en el modelo **Rho**₂ que están implicados con perturbaciones significativas de la densidad electrónica deformada y encontradas en la región central del retinal para **Rho**₁. La distorsión geométrica central está relacionada con la reducción de la deslocalización de la carga en ambos mutantes, apareciendo esta mucho menos deslocalizada en el mutante hS186W (**Rho**₂), el cual se muestra menos planar en la región central del retinal (Tabla 7; Figura 21). En el retinal, la torsión geométrica central se hace más relevante, así como la reducción de la deslocalización de la carga electrónica cuando se va desde las rodopsinas WT hacia los mutantes hM207R y hS186W (Tablas 6 y 7; Figuras 18, 19, 20 y 21). Estos resultados están en total acuerdo con los cambios significativos de la ALE y el cambio espectral entre estos sistemas (*vide supra*); se conoce que tanto ALE como EVE son muy sensibles a los cambios de la deslocalización de la carga electrónica de los cromóforos^{13,75,97}.

Tabla 7. Momento multipolar ($m = 0$, $l = 2$) de los átomos implicados con la deformación de la densidad electrónica en el enlace C₁₀—C₁₁ del retinal. Ángulo diedro (φ) para el enlace relacionado con la perturbación electrónica. Estos valores corresponden al estado no excitado del retinal optimizado a un nivel QM/MM usando el modelo **Rho**₂. Los componentes del cuadrupolo están expresados en unidades atómicas y el ángulo diedro en grados.

Estructura	C ₁₀ ($m = 0$, $l = 2$)	C ₁₁ ($m = 0$, $l = 2$)	φ C ₉ =C ₁₀ —C ₁₁ =C ₁₂
hWT	1,291	0,830	170,3
hM207R	1,215	0,732	160,1
hS186W	0,687	0,872	153,3

El método DAM permite describir ahora el patrón de deslocalización completo del retinal, incluso dentro del ambiente intra—molecular de la rodopsina. El análisis del sistema electrónico π conjugado del 11—*cis*—retinal por las deformaciones de la densidad electrónica junto con factores geométricos asociados con perturbaciones del ambiente de la opsina (identificados *a priori* por

dicho análisis) proporciona un nuevo y útil enfoque para la comprensión de las propiedades ópticas de pigmentos visuales que porten como cromóforo al retinal.

3.4.1. Análisis de los ángulos de torsión geométrica central del retinal

La torsión importante de la cadena polieno del retinal, como una consecuencia del ambiente de la rodopsina, está bien documentada por estudios espectroscópicos y de modelación molecular¹⁹³. En la Tabla 8 se describen los ángulos de torsión geométrica ω_1 , ω_2 y ω_3 correspondientes al estado no excitado de los retinales optimizados a un nivel QM/MM del modelo **Rho₁** (WT y mutantes). El ángulo ω_1 es descrito entre los planos (ρ) formados por los átomos C₆–C₇=C₈ (ρ_1) y C₁₄–C₁₅=N (ρ_2). Los ángulos de torsión ω_2 y ω_3 son descritos en la Figura 22. Algunas aproximaciones teóricas han descrito la torsión del retinal en la rodopsina bovina usando el ángulo ω_1 , que muestra valores de 40,0° y 44,0° a partir tanto de estudios de MD clásica como combinada con el método QM/MM, respectivamente⁹⁸. Estos valores concuerdan con los valores promedio de ω_1 obtenidos para los sistemas bWT y hWT (Tabla 8).

Tabla 8. Valores promedio de los ángulos de torsión ω_1 , ω_2 y ω_3 (en grados), los cuales corresponden al estado no excitado del retinal de las estructuras optimizadas a un nivel QM/MM (modelo **Rho₁**). Ver texto y Figura 22 para la descripción de los ángulos de torsión.

Estructura	ω_1	ω_2	ω_3
bWT	39,3 ± 0,5 ^(a)	26,4 ± 1,8	7,8 ± 1,4
hWT	40,1 ± 1,7	25,6 ± 0,5	8,1 ± 0,8
hM207R	64,0 ± 1,5	29,4 ± 1,7	17,4 ± 1,0
hS186W	49,3 ± 7,8	38,6 ± 6,4	33,1 ± 6,7

^(a) Media aritmética ± desviación típica.

Los valores de ω_1 indican mayor torsión del retinal en ambos mutantes con respecto a las rodopsinas WT, siendo más torcido el cromóforo en el mutante hM207R (Tabla 8). Otras distorsiones helicoidales, que llevan a la no planaridad en el retinal, han sido descritas a través del ángulo

entre planos que contienen los átomos C₇ y C₁₀ del cromóforo para un plano, y C₁₃ y C₁₅ para el otro, o usando el ángulo de torsión H—C₁₀—C₁₁—H¹⁹³. Obviamente, el ángulo ω_1 describe la torsión del cromóforo considerando ambos extremos del retinal, a diferencia de los ángulos ω_2 y ω_3 (Figura 22); por lo que, los valores de este ángulo (ω_1) reflejan un retinal más torcido en el mutante hM207R aunque no en su región central. Por otro lado, la menor torsión del ángulo diedro $\varphi_{C_{10}-C_{11}=C_{12}-C_{13}}$ que se calcula para los mutantes con respecto a WT resultaría en conformaciones no favorables para la reacción de fotoisomerización más que en un comportamiento espectral diferente.

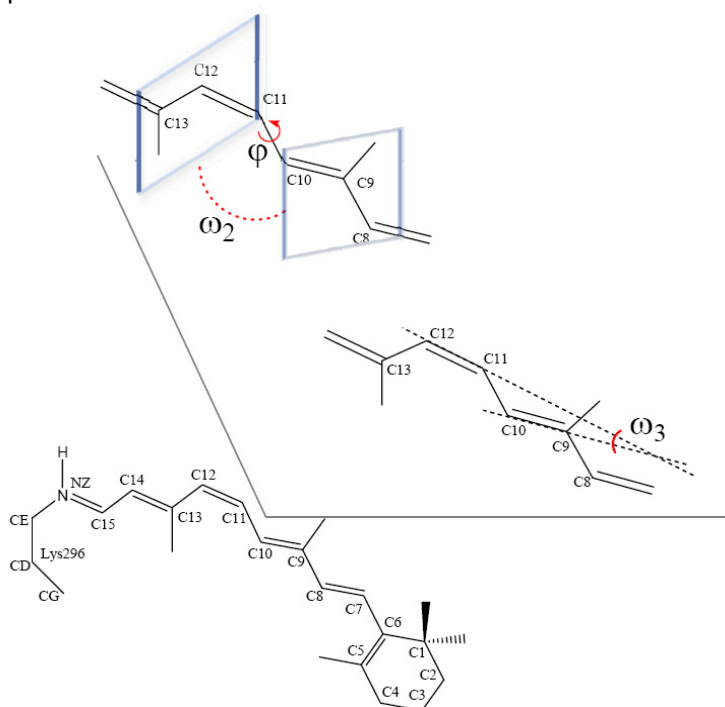


Figura 22. Diagrama de ángulos de torsión para el 11-*cis*-retinal; φ : ángulo diedro (C₉=C₁₀—C₁₁=C₁₂); ω_2 : ángulo de torsión entre los planos ρ_3 (C₈—C₉=C₁₀) y ρ_4 (C₁₁=C₁₂—C₁₃); ω_3 : ángulo de torsión entre los planos ρ_5 que contiene los átomos del enlace C₉=C₁₀ y el punto (x_{C_9} , y_{C_9} , 0) y ρ_6 formado por los átomos del enlace C₁₁=C₁₂ y el tercer punto ($x_{C_{12}}$, $y_{C_{12}}$, 0).

La discontinuidad de las isosuperficies calculadas para las deformaciones de la densidad electrónica sobre un lado del componente π conjugado del retinal (*vide supra*) sugiere explorar distorsiones geométricas que llevan a la pérdida de la planaridad. Aunque aquí, ambas torsiones de la

cadena poliénica en torno a las regiones centrales y de las bases de Schiff en los retinales han sido relacionadas con propiedades espectrales, la torsión central del retinal aparece como una evidente fuente común y muy importante de perturbación sobre el sistema π conjugado de todas las estructuras analizadas. Anteriormente, el ángulo diedro fue usado como una forma convencional para explorar la torsión helicoidal del retinal (Tablas 6 y 7; Figura 22). En la Tabla 8, el ángulo ω_2 de torsión helicoidal muestra valores más elevados para hM207R y hS186W que para las rodopsinas WT, siendo otra vez hS186W el sistema menos planar en el enlace simple C₁₀—C₁₁. El ángulo ω_3 describe apropiadamente la forma arqueada del retinal en todos los sistemas, mostrando una molécula más curva en ambos mutantes con respecto a las rodopsinas normales. El 11—*cis*—retinal en el mutante hS186W es aproximadamente dos veces más arqueado que en el otro mutante en la región central del cromóforo (Tabla 8). Estas torsiones helicoidal y arqueada del 11—*cis*—retinal también conllevan a una distancia C₁₀—C₁₁ mayor en las estructuras que exhibieron menos planaridad, 1,44 Å (hM207R) y 1,45 Å (hS186W) en comparación con 1,43 Å en los sistemas con mayor planaridad (bWT y hWT) de este enlace.

El ángulo $\varphi_{C_9=C_{10}-C_{11}=C_{12}}$ fue calculado en las estructuras de los modelos **Rho_n** y **Ret_{gas}** para identificar su relación con la ALE. Esta dependencia fue explorada porque cuanto más decrecen los valores de $\varphi_{C_9=C_{10}-C_{11}=C_{12}}$ entre 90 y 180°, mayor es la perturbación del sistema π conjugado del retinal en el enlace C₁₀—C₁₁ (Tablas 6 y 7; Figuras 18, 19, 20 y 21). Este hecho lleva a una reducción de la extensión de la nube π (deslocalización de la carga) y un incremento de la ALE. Por lo tanto, la torsión del retinal en el enlace C₁₀—C₁₁ puede ser un factor relevante para los mecanismos de ajuste espectral. Se muestra la asociación entre los valores de ALE (en angstroms) y de $\varphi_{C_9=C_{10}-C_{11}=C_{12}}$ (en grados) usando tanto una descripción lineal como cuadrática (Figura 23). Se describe así un grado de dependencia directa entre los valores de ALE y la pérdi-

da de planaridad (valores de $\varphi_{C_9=C_{10}-C_{11}=C_{12}}$ alejados de 180 ó 0°). Las relaciones lineal y cuadrática muestran valores muy similares de R^2 y $rmsd$ (Figura 23). La función cuadrática describe la predicción de los valores de ALE con mayor significado físico que la función lineal (Figura 23). Un conjunto de datos más extenso que incluya valores de $\varphi_{C_9=C_{10}-C_{11}=C_{12}}$ en el rango desde 0 a 90° mejoraría los parámetros de ajuste de la función polinómica. Esta relación geométrica (ALE vs $\varphi_{C_9=C_{10}-C_{11}=C_{12}}$) es consistente con el vínculo conocido entre torsiones helicoidales en la estructura del cromóforo y cambios en su estructura electrónica^{31,81,84}, lo cual puede regular la longitud de onda a la que absorbe el retinal de pigmentos visuales^{81,82,84}.

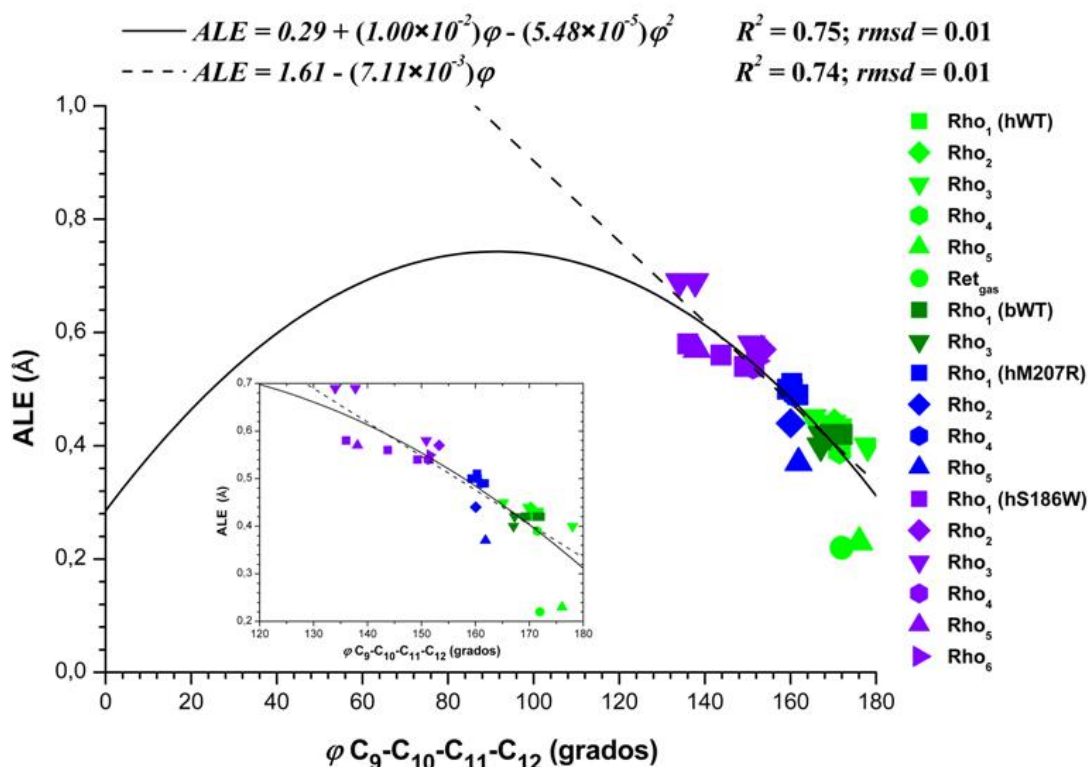


Figura 23. Alternancia de longitud de enlace vs $\varphi_{C_9=C_{10}-C_{11}=C_{12}}$. La intercalación expande la región del ángulo φ desde 120 a 180°.

Recientes estudios manifiestan que ciertos cambios en la red de puentes de hidrógeno también pueden regular los espectros de absorción en proteínas retinales^{30,97,199}. En el presente trabajo, mostramos que la mayor perturbación de la red de puentes de hidrógeno tuvo lugar en los siste-

mas con mayores valores de EVE. Por ello es esperable que en estos cambien las propiedades espectrales. No obstante, este mecanismo puede ser reducido a alteraciones de la interacción entre el cromóforo y los residuos aminoacídicos alrededor de este, siendo la perturbación en la red de puentes de hidrógeno una base química consistente para la desestabilización del núcleo proteínico en rodopsinas como muestran nuestros resultados, y un estudio experimental reciente³⁹. Adicionalmente, es razonable enunciar que ciertas sustituciones de residuos de aminoácidos ubicados lejos del cromóforo podrían también llevar a una reorganización estructural significativa de la rodopsina y a distorsiones del retinal debido a interacciones estéricas. Lo anterior tiene posibles implicaciones para el ajuste espectral y evidencia la importancia de otros factores en adición a los efectos electrostáticos.

3.5. Relación entre la alternancia de longitud de enlace y la energía vertical de excitación

El vínculo tentativo y esperable entre la torsión del retinal y las EVE sugiere la necesidad de explorar también la relación EVE (energía del estado singlete excitado S_1) vs ALE usando valores del mismo conjunto de datos (modelos $\mathbf{Rho}_n$ y $\mathbf{Ret}_{gas}$), sobre todo por lo que ello significa para confirmar explicaciones intuitivas de estas relaciones. Varios estudios teóricos han documentado una relación lineal entre la energía del estado S_1 y la ALE para el amplio rango UV—Vis de algunos sistemas y particularmente para el 11—*cis*—retinal^{13,79,144,200,201}. Una función lineal y otra polinómica de segundo orden (cuadrática) representan dos relaciones entre los valores de EVE (en electronvoltios) y ALE (en angstroms), usando todos los modelos (Figura 24). La función cuadrática muestra un valor de R^2 mayor y de *rmsd* aproximadamente dos veces menor con respecto a cada parámetro (R^2 o *rmsd*) correspondiente a la función lineal (Figura 24). Además, la función polinómica muestra el comportamiento espectral del polieno retinal como función de la ALE y describe muy bien el rango de EVE desde 1,97 a 3,54 eV en proteínas retinales^{13,201}. Esta

función cuadrática predice apropiadamente EVE entre 1,88 y 2,02 eV (613–659 nm). Estos valores son cercanos a aquellos entre 610 y 635 nm reportados para el retinal en el vacío^{66,73,194}.

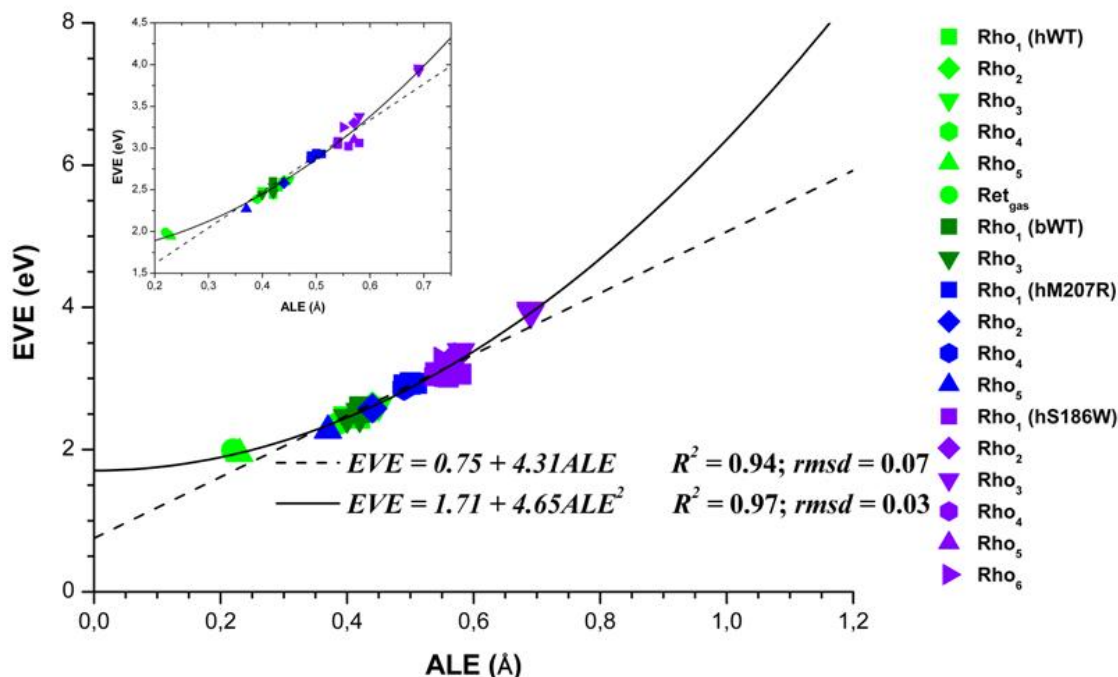


Figura 24. Energías verticales de excitación vs alternancia de longitud de enlace. La intercalación expande la región de alternancia de longitud de enlace desde 0,20 a 0,80 Å.

Esta predicción de la función no lineal para el retinal al vacío es realizada con los valores de ALE en el rango de 0,19–0,26 Å, reportados en otros estudios relacionados con el retinal o sus análogos en la fase gas⁶⁶; en lugar del valor de ALE calculado para la estructura del modelo **Ret_{gas}** (0,22 Å) e incluido en ese rango. No existen contradicciones entre la predicción de la función cuadrática para los valores de EVE del retinal en el vacío y el experimento que afirma un pico máximo de absorción a 610 nm para la forma 6–s–*trans* del retinal en ese medio¹⁹⁵. La función no lineal describe la dependencia entre los valores de EVE y ALE en lugar de EVE vs conformación 6–s–*cis* del retinal. Quizás, la conformación 6–s–*trans* del retinal que aparece absorbiendo en 610 nm podría tener un valor de ALE cercano al calculado para el retinal en la estructura del modelo **Ret_{gas}** que lo hace a 622 nm. Se conoce que la conformación 6–s–*cis* influye en

las EVE^{31,66,84,195}, afectando la deslocalización de la carga o la ALE. Esta última propiedad es sensible no solo a los cambios en la conformación 6—s—cís sino también a otros factores que afectan el sistema π conjugado³⁰.

La imposición de un valor de ALE en el retinal de 1,01 Å que corresponde con un polieno no conjugado hipotético lleva a una predicción de la EVE de 6,45 eV ($\lambda_{\text{máx}} = 192$ nm) a partir de la función cuadrática en concordancia con los valores experimentales de 6,60—7,30 eV (170—188 nm) para espectros de absorción de hidrocarburos no conjugados insaturados²⁰². Por otro lado, la función cuadrática predice un valor de EVE de 1,71 eV ($\lambda_{\text{máx}} = 725$ nm) para un sistema polieno hipotético completamente conjugado (ALE = 0 Å, similar a cianinas⁸⁴), consistentemente con la predicción del límite hacia el infinito para polienos realizada por extrapolación en estudios espectrales sobre polienos oligoméricos, muy similares a polienos simples y carotenoides²⁰³. Por lo antes dicho, la nueva generalización mediante la función no lineal sugiere que el espectro del retinal tiene características intermedias entre los espectros de polienos no conjugados y las cianinas. Lo anterior es consistente con una propuesta previa para comprender la banda de absorción principal de pigmentos visuales en términos del comportamiento espectral de polienos y cianinas típicas⁸⁴. Además, estos hallazgos invitan a realizar nuevos estudios que enriquezcan el conjunto de datos con modelos de polienos distintos al retinal y así incrementar los valores de EVE y ALE con vista a explorar el tipo de relación no lineal encontrada en este trabajo para todos los polienos.

3.6. Consecuencias potenciales del exceso de energía en rodopsinas

Una vía habitual para generar oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) es por medio de la fotosensibilización¹⁰⁸, y a nuestro juicio, en el tejido retiniano están garantizados todos los elementos necesarios para esta reacción⁴. Hasta ahora, no se ha identificado sin ambigüedad, el cromóforo principal relacionado

con la oxidación fotosensibilizada inicial asociada al daño tipo Noell inducido por la luz en la retina. Sin embargo, los complejos 11-*cis*-retinal-opsina (pigmentos visuales) son a todas luces candidatos razonables para estar relacionados con este daño fotoquímico retiniano de clase I. Esto sería debido a que en ellos está el escenario principal de los procesos fotofísicos y fotoquímicos de este sistema por la alta concentración en los fotorreceptores y la coincidencia entre la absorción de los fotopigmentos y el espectro de acción del daño tipo Noell^{5,107,120,127}.

Los cálculos a un nivel QM/MM sobre la rodopsina nos permite establecer comparativamente importantes valores promedio de propiedades estimadas: la diferencia de energía entre los estados excitados S_1 y T_1 ($\Delta E_{S_1-T_1}$), la energía del primer estado excitado triplete (E_{T_1}) y el potencial de ionización (PI_{aprox}) del estado excitado T_1 para cada región QM, considerando el ambiente proteínico restante. Las evidencias disponibles sobre la rodopsina no la implican en reacciones de fotosensibilización, sin embargo los cálculos al nivel QM/MM muestran que los valores de $\Delta E_{S_1-T_1}$ y E_{T_1} incluso en las rodopsinas normales (WT) son mayores que 94 kJ/mol (Tabla 9). Por lo tanto, tales valores superan la energía necesaria para excitar el oxígeno molecular a su primer estado excitado, el 1O_2 ^{115,204}.

Tabla 9. Diferencias de energía (ΔE) calculadas entre estados de la región QM para cada sistema. Los valores de energía están expresados en kJ/mol.

Estructura	$\Delta E_{S_1-T_1}$	$\Delta E_{T_1-S_0}^*$	$\Delta E_{S_1-S_0}$
bWT	$138,8 \pm 2,6^{(a)}$	$108,2 \pm 0,9^{(a)}$	$247,0 \pm 3,3^{(a),(b)}$
hWT	$133,7 \pm 4,9$	$107,7 \pm 1,4$	$241,5 \pm 4,7$
hM207R	$171,5 \pm 3,2$	$110,7 \pm 1,9$	$282,2 \pm 1,3$
hS186W	$178,2 \pm 7,5$	$116,0 \pm 7,5$	$294,3 \pm 2,5$

^(a) Media aritmética $\pm$ desviación típica.
^(b) Valor experimental: 240,2 kJ/mol^{145,189}.
^{*} E_{T_1} .

No obstante, la generación fotosensibilizada de oxígeno singlete por interacción y desactivación del estado S_1 con el oxígeno molecular ($^3\text{O}_2$)^{114,115,204}, a pesar de $\Delta E_{S_1-T_1} > 130$ kJ/mol, es poco probable debido a que los tiempos de vida de los estados S_1 son desfavorables para que la energía se emplee en una transferencia hacia una molécula externa, aun siendo tan simple y ubicua como el $^3\text{O}_2$. Este proceso se dificulta cuando tiene que competir con una rápida reacción de isomerización 11-*cis*/all-*trans* en el estado S_1 o un cruzamiento entre sistemas (ISC^y; “ $S_1 \rightarrow T_1$ ” del retinal)^{189,191,205,206}, que son procesos intra-moleculares aunque estén desfavorecidos por la paridad de spin electrónico.

Los excesos mínimos de energía en bWT y hWT son 100,6 y 95,1 kJ/mol respectivamente, los cuales son obtenidos a partir de la diferencia entre $\Delta E_{S_1-S_0}$ calculada (energía absorbida, EVE) de cada rodopsina WT (Tabla 9) y el máximo de energía almacenada ($EA_{m\acute{a}x}$) reportada en el compuesto intermedio batorodopsina (146,4 kJ/mol)^{73,189}. Otra vez, nuestros cálculos muestran que existe suficiente energía ($EVE - EA_{m\acute{a}x} > 94$ kJ/mol) disponible en el núcleo proteínico de ambas rodopsinas WT para excitar el estado base (triplete no excitado) del oxígeno molecular (O_2) a la especie reactiva $^1\text{O}_2$.

Los estados T_1 de bWT y hWT muestran energías suficientes ($E_{T_1} \geq 94-95$ kJ/mol^{112,115,204}) para permitir una transferencia de energía electrónica hacia el estado base del oxígeno molecular (Tabla 9). Por lo tanto, la reacción fotosensibilizada en el sitio de unión del retinal de ambas rodopsinas WT debe ser tomada en cuenta desde el punto de vista energético y en este caso el tiempo de vida del triplete que se produce, así como la afinidad en la multiplicidad de spin pueden ser un factor importante en la producción de $^1\text{O}_2$ a partir del triplete $^3\text{O}_2$ base.

^y Del inglés Intersystem Crossing.

Clásicamente, puesto que los orbitales frontera están ubicados sobre el 11-*cis*-retinal como es mostrado aquí (Figura 14) y documentado para la rodopsina bovina^{36,66,201}, asumimos que este cromóforo embebido en las opsinas es el residuo responsable que absorbe luz para acciones fotosensibilizadoras potenciales dentro de la región QM en los sistemas analizados (bWT, hWT, hM207R y hS186W). La esfera de actividad intracelular del oxígeno singlete a partir de su punto de producción, con un radio mínimo de 100 Å^{115,204,207,208}, hace totalmente posible la interacción de esta especie reactiva del oxígeno con residuos aminoacídicos cerca del 11-*cis*-retinal o distantes del SR (Figura 25).

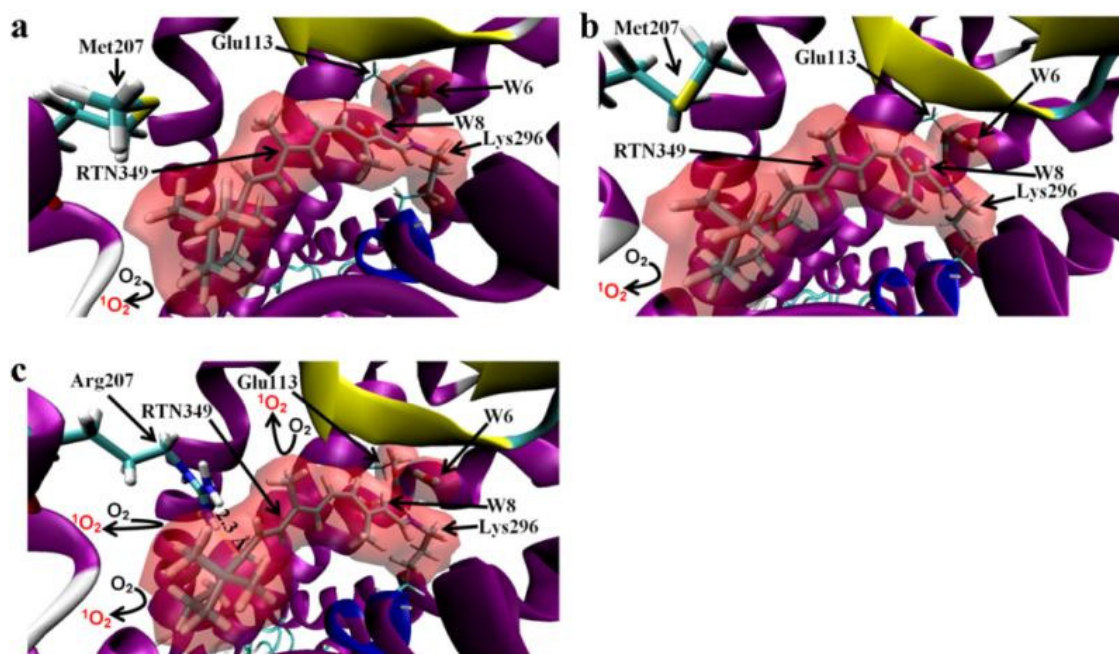


Figura 25. Reacción de fotosensibilización propuesta en el sitio de unión del retinal: a) bWT; b) hWT; y c) mutante hM207R. Se resalta la región QM que incluye al sistema 11-*cis*-retinal–parte del residuo Lys296, parte del residuo Glu113 y dos moléculas de agua (W6 y W8) para todos los sistemas calculados. La notación para los residuos es la usada en el fichero *1U19.pdb*^{15,68}. Se muestra los sitios de la hipotética formación de oxígeno singlete para representar la posible fotosensibilización.

El tiempo de vida corto del retinal excitado debido a la rápida reacción de fotoisomerización y la desactivación a través del proceso de conversión interna (IC^z)²⁰⁹ han sido argumentados para descartar la extinción de los estados excitados del retinal por interacción con el oxígeno molecular¹⁰³. Sin embargo, se ha demostrado recientemente que el proceso de IC puede resultar en generación de oxígeno singlete en algunas moléculas^{114,115,204}. Por otro lado, la configuración electrónica $n\pi^*$, la agregación y la polaridad pueden acortar el tiempo de vida del estado T_1 del fotosensibilizador¹⁰⁸. Por lo tanto y en los sistemas analizados aquí, se podría esperar un apropiado tiempo de vida del estado T_1 para su apagamiento por $^3\text{O}_2$ debido a las transiciones $\pi\pi^*$ del 11-*cis*-retinal descritas antes, la neutralidad del SR también descrita para rodopsina bovina¹⁹³ y un aislado 11-*cis*-retinal unido covalentemente al residuo Lys296 en todos los sistemas como es descrito para el sistema bovino⁴².

En adición, la reacción fotosensibilizadora pro-oxidante inducida por la luz visible no es un fenómeno improbable en el estado no excitado de la rodopsina debido a: (i) la absorción intensa de luz alrededor de 500 nm^{42,65}; (ii) la alta tensión de oxígeno molecular en la retina^{4,103,121,210}; (iii) los estados excitados singlete y triplete, y el proceso ISC descritos para el retinal^{189,191,205,206}; (iv) la difusión documentada de oxígeno molecular y su sensibilización a través de matrices polipeptídicas^{211,212}; (v) el estrés oxidativo inducido por la luz reportado en la retina²¹³⁻²¹⁶; y (vi) la extinción del estado excitado triplete del 11-*cis*-retinal a causa de su interacción con el oxígeno molecular en soluciones oxigenadas, rindiendo $^1\text{O}_2$ eficientemente²⁰⁵.

La implicación de los cromóforos all-*trans*-retinal y all-*trans*-retinol como moléculas fotosensibilizadoras para causar el daño oxidativo inicial en retina está aún en debate^{5,103}. En personas longevas, el fotosensibilizador all-*trans*-retinal puede ser completamente descartado para este

^z Del inglés Internal Conversion.

tipo de daño fotoquímico en la retina porque su espectro de absorción máximo está por debajo de 450 nm, lo cual es el límite inferior de longitud de onda para el cristalino envejecido⁵.

Las defensas antioxidantes eficientes en el sistema ocular retardan, bajo condiciones normales, el daño oxidativo inducido por la luz^{4,217}. Por lo tanto, la acción pro—oxidante potencial de pigmentos visuales normales pudiera ser atenuada o neutralizada. No obstante, este no es probablemente el caso en escenarios patológicos. Aún si se analiza, por ejemplo, el sistema con menos absorción de energía entre los mutantes y que porta como los sistemas WT una BSP, hM207R (Tabla 4; Figura 15), se puede apreciar que los cambios causados por la sustitución aminoacídica anormal influyen en variables físico—químicas que podrían favorecer la reacción de fotosensibilización en este mutante.

En hM207R, el voluminoso grupo guanidino (cargado positivamente) del residuo aminoacídico Arg207 aparece orientado hacia el anillo β —ionona del retinal a un valor promedio, similar a las distancias de puentes de hidrógeno, de 2,3 Å (Figura 25c). Este grupo de Arg207 puede inducir significativos cambios conformacionales y electrónicos en la cadena poliénica del retinal embebido en las opsinas afectadas y también afectar sus propiedades espectrales (Tablas 3, 4, 6 y 8; Figuras 11, 12, 15 y 19). Además, se han sugerido efectos de polarización electrónica por grupos cargados cerca del anillo β —ionona del retinal¹³, lo cual puede alterar la estructura electrónica e importantes propiedades físico—químicas del cromóforo. La alta susceptibilidad al ambiente que se ha reportado para la producción de oxígeno singlete mediante un proceso de fotosensibilización²¹⁸ invita a explorar la influencia de sustituciones aminoacídicas como M207R sobre las potencialidades fotosensitivas de la rodopsina.

Aun cuando, las consecuencias energéticas sobre la reacción de fotoisomerización no aparecieron dependiendo significativamente del ángulo diedro $\varphi_{C_{10}-C_{11}=C_{12}-C_{13}}$ del retinal que está

menos pre—torcido en hM207R (Tabla 3), su ángulo diedro $\varphi_{C_9=C_{10}-C_{11}=C_{12}}$ es más torcido que en las rodopsinas WT (Tabla 6) y la red de puentes de hidrógeno está significativamente perturbada (Figuras 8 y 9; Tabla 2), lo cual también puede afectar la reacción de fotoisomerización^{39,219}. El rendimiento cuántico de la isomerización *cis*—*trans* no se incrementará por la magnitud del cambio espectral promedio hacia el azul calculado en este trabajo para hM207R (424 nm vs 496 nm en hWT), debido a que la dependencia de la eficiencia de esta reacción con la longitud de onda no tiene lugar cuando el cambio hacia el azul está por debajo de 500 nm²⁰⁹.

Como se menciona antes, el exceso de energía en mutantes pudiera llevar a reacciones colaterales dañinas por no compensarse adecuadamente mediante otros procesos tal y como debe ocurrir en las rodopsinas normales, aún teniendo estas rodopsinas mutantes una endotermicidad similar a las WT en sus intermediarios batorodopsinas. Bajo esta suposición, el exceso de energía mínimo ($EVE - EA_{m\acute{a}x}$) de 135,8 kJ/mol en el mutante hM207R es mayor que en las rodopsinas normales. En hM207R, el estado T_1 es óptimo desde el punto de vista energético ($E_{T_1} > 95$ kJ/mol) para ser extinguido por su interacción con el 3O_2 y generar 1O_2 (Tabla 9). En el mutante hS186W, existen condiciones energéticas y conformacionales (Tablas 2, 3, 6 y 9; Figuras 8 y 9) como en el mutante hM207R, lo cual permite también plantear para el primero (hS186W) y bajo el mismo razonamiento, potencialidades para la fotosensibilización.

Sin embargo, el valor promedio calculado del PI_{aprox} para el estado T_1 de la región QM fue más elevado en el mutante hM207R al compararse con las demás rodopsinas analizadas (Tabla 10). La ubicación de los orbitales frontera sobre el 11—*cis*—retinal (Figura 14) y el comportamiento de los valores del PI_{aprox} calculados apuntan a cambios en las propiedades redox del cromóforo debido a la sustitución aminoacídica M207R.

Tabla 10. Potencial de ionización (PI_{aprox}) calculado a partir de los valores negativos de la energía del HOMO para el estado excitado T_1 . Los valores se expresan en electronvoltios.

Estructura	$PI_{T_1}^{aprox}$
bWT	$4,9 \pm 0,2^{(a)}$
hWT	$4,6 \pm 0,2$
hM207R	$5,5 \pm 0,1$
hS186W	$4,8 \pm 0,1$
^(a) Media aritmética $\pm$ desviación típica.	

Una aproximación apropiada al comportamiento del potencial de oxidación (E_{ox}) puede ser obtenida a partir de valores del potencial de ionización para propósitos comparativos porque existe una dependencia directa entre estas propiedades. Por lo tanto en este mutante (hM207R), se podría esperar una mayor eficiencia para generar oxígeno singlete (S_Δ) durante la extinción del estado T_1 por su interacción con O_2 con respecto a los sistemas normales a causa del PI_{aprox} elevado (mayor E_{ox}). Un incremento del E_{ox} lleva sistemáticamente a un incremento de S_Δ del estado excitado T_1 ¹⁰⁸. Por lo antes dicho, el 11-*cis*-retinal en la opsina del mutante hM207R sería un peor extinguidor del oxígeno singlete, teniendo en cuenta que la desactivación de 1O_2 es incrementada cuando comparativamente el potencial de oxidación es más bajo¹¹⁴. Se debe tener en cuenta que en este mutante la reacción de fotosensibilización puede ser favorecida también porque la fotoisomerización podría no ocurrir apropiadamente (*vide supra*) para disipar mediante trabajo químico la parte correspondiente de la energía absorbida en la región QM.

Por otro lado, no se ha reportado la influencia del estado de protonación de la base de Schiff sobre la actividad fotosensibilizadora del retinal aunque la protonación de grupos aminas funcionales en fotosensibilizadores disminuye el rendimiento para la generación de oxígeno singlete²¹⁸. Además, una BSD lleva a un fuerte cambio espectral hacia el azul⁴² por tanto, no hay razón para

descartar una actividad pro—oxidante en hM207R debido a cambios en el estado de protonación de la BSP previamente calculada (Tabla 5).

El envejecimiento puede disminuir gradualmente la cantidad de luz visible con longitud de onda corta que impacta la retina¹⁰³ (el límite de longitud de onda del cristalino para el paso de luz en personas longevas ha sido reportado en 450 nm⁵). No obstante, el máximo de absorción de luz promedio calculado (420 nm) para la rodopsina mutante hM207R sobrepasa el límite de transmisión de longitudes de onda de los cristalinicos en primates jóvenes que es 320 y 365—400 nm para edades por debajo y por encima de 22 años, respectivamente^{103,107,118}. Obviamente, la luz azul que absorbe la rodopsina mutante hM207R puede alcanzar plenamente a las retinas de humanos jóvenes afectados genéticamente por la mutación. Además, la tensión de oxígeno molecular puede ser dramáticamente alta durante la vida neonatal debido a un flujo sanguíneo no regulado⁴ y progresivamente incrementada debido a la muerte de fotorreceptores que ocurre en la RP^{6,220}. Estos hechos pueden conducir a mejores condiciones pro—oxidantes en la retina afectada por este tipo de RP. El daño oxidativo inducido por la luz puede afectar proteínas y lípidos en el tejido retiniano⁸; curiosamente, la rodopsina está embebida en una membrana compuesta por lípidos insaturados¹⁵⁸.

A partir de nuestros hallazgos inclusive en el mutante con menor absorción de energía, es razonable conjeturar desde el punto de vista energético que la fotosensibilización en el SR del mutante hM207R daría origen a un daño fotoquímico incrementado en la retina desde los primeros años de vida por predisposición genética. Como se menciona antes, en el tejido retiniano y en la molécula de rodopsina están disponibles todos los requerimientos para una destructiva reacción colateral fotosensibilizadora. Esta reacción, se potenciaría sistemáticamente por mutaciones causantes de una mayor absorción de energía en rodopsinas por encima de la capacidad seleccionada

naturalmente para ser disipada o atenuada. Particularmente en este mutante hM207R, no solo se observan cambios conformacionales y energéticos sino también redox que tentativamente sugieren una potencial actividad fotosensibilizadora desequilibrada por el retinal ubicado en el núcleo de la rodopsina (Tablas 6, 8, 9 y 10). Consecuentemente, la generación de oxígeno singlete por fotosensibilización en rodopsinas mutantes pudiera extenderse no solo al resto de la proteína sino también a su membrana huésped y llevar al daño oxidativo vinculado a la apoptosis del fotorreceptor en la retina afectada por estas variantes de RP. Estos resultados establecen una nueva pregunta que puede ser relevante para comprender mecanismos moleculares en la patogenia de distrofias retinianas y del daño fotoquímico en la retina. También esta propuesta pudiera ayudar a orientar estrategias médicas futuras que tengan en cuenta los efectos de una mutación más allá de las consecuencias sobre la estabilidad de la rodopsina. Tales estrategias implicarían, por ejemplo: (i) realizar un diagnóstico molecular oportuno; (ii) evitar o reducir el impacto sobre la retina de radiación con longitud de onda no apropiada; y (iii) asumir estilos de vida y terapias de forma personalizada que con énfasis eviten o reduzcan situaciones pro—oxidantes y favorezcan las condiciones antioxidantes adecuadas desde edades tempranas.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

La nueva combinación de métodos teórico—computacionales de última generación usada por primera vez para contribuir a explicar consecuencias al nivel molecular de mutaciones sobre la rodopsina humana y causantes de Retinosis Pigmentaria permite concluir que:

1. La metodología de modelación molecular implementada resultó ser confiable para resolver las estructuras tridimensionales, predecir propiedades físico—químicas de rodopsinas humanas y facilitar la descripción de características importantes del sistema electrónico π conjugado del retinal. Los resultados obtenidos en las predicciones espectrales y algunas otras propiedades para las rodopsinas bovina y humana están en muy buena correspondencia con los datos experimentales disponibles, lo que aumenta la efectividad predictiva de los métodos y modelos nanoscópicos utilizados para sistemas muy complejos y completos.
2. Las sustituciones aminoacídicas M207R y S186W aparecen perturbando la red de puentes de hidrógeno en el núcleo proteínico, así como desviando la conformación del 11—*cis*—retinal y disminuyendo la deslocalización de la carga en este cromóforo. Esto conduciría a una desestabilización estructural y afectación de la eficiencia en la reacción de fotoisomerización subsecuente a la excitación, así como que refleja una perturbación de la estructura electrónica del cromóforo 11—*cis*—retinal unido a la opsina de las rodopsinas mutantes.
3. Se calculó un corrimiento espectral hipsocrómico con respecto a la referencia normal de las rodopsinas con las sustituciones M207R y S186W, lo que puede causar un exceso de energía absorbida. Las distorsiones geométricas que aparecen en las regiones central y de la base de Schiff del retinal, las influencias electrostáticas sobre el cromóforo y el estado de protonación de dicha base pueden ser los factores más relevantes para el cambio espectral. El cam-

bio espectral más relevante hacia el azul apareció en el mutante portador de la sustitución S186W.

4. Los indicios calculados para los procesos fotofísicos en la rodopsina normal permiten suponer potencialidades energéticas para una reacción de fotosensibilización que pueda conducir a especies reactivas del oxígeno molecular, como es el caso de su estado singlete de menor energía. Los cambios conformacionales, energéticos y redox en el retinal de la rodopsina con la sustitución M207R harían más probable la generación fotosensibilizada de oxígeno singlete en el núcleo proteínico.
5. El cálculo de las deformaciones de la densidad electrónica proporcionó una detallada descripción del sistema electrónico π conjugado del retinal. Las perturbaciones del componente π conjugado en mutantes permitieron detectar *a priori* distorsiones geométricas relevantes, explicar el comportamiento de propiedades espectrales y revelar la distorsión geométrica central en el cromóforo como un factor común e importante para los mecanismos de ajuste espectral de pigmentos visuales.
6. Se encontró una descripción robusta mediante una función no lineal para la dependencia directa entre las energías verticales de excitación y la alternancia de longitud de enlace en el retinal que tiene un posible valor práctico para la predicción del color de los pigmentos visuales.

RECOMENDACIONES

RECOMENDACIONES

1. La metodología implementada en este trabajo puede ser recomendada con fines explicativos y predictivos en el sistema rodopsina para estudiar el proceso de la visión, efectos de mutaciones y apoyar el diseño de proteínas fotosensitivas.
2. Se debe explorar, teórica y experimentalmente, el nuevo replanteamiento que establece esta investigación sobre la potencial actividad fotosensibilizadora del retinal en rodopsinas normales y mutantes. En este sentido, nuevas evidencias permitirían identificar vínculos directos entre efectos de la luz en rodopsinas y la apoptosis de células en retina. Consecuentemente, esto contribuiría a la comprensión de los mecanismos moleculares relacionados con el daño retiniano causado por la luz, con o sin predisposición genética.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Merin, S. & Auerbach, E. Retinitis pigmentosa. *Surv. Ophthalmol.* **20**, 303-346 (1976).
2. Peláez, O. *Retinosis Pigmentaria*, 159 pp (Editorial Científico-Técnica, La Habana. Cuba, 1997).
3. Baumgartner, W.A. Etiology, pathogenesis, and experimental treatment of retinitis pigmentosa. *Med. Hypotheses* **54**, 814-824 (2000).
4. Lien, E.L. & Hammond, B.R. Nutritional influences on visual development and function. *Prog. Retin. Eye Res.* **30**, 188-203 (2011).
5. Hunter, J.J., Morgan, J.I.W., Merigan, W.H., Sliney, D.H., Sparrow, J.R. & Williams, D.R. The susceptibility of the retina to photochemical damage from visible light. *Prog. Retin. Eye Res.* **31**, 28-42 (2012).
6. Usui, S., Oveson, B.C., Lee, S.Y., Jo, Y.-J., Yoshida, T., Miki, A. *et al.* NADPH oxidase plays a central role in cone cell death in retinitis pigmentosa. *J. Neurochem.* **110**, 1028-1037 (2009).
7. Wang, K., Poon, C.-T., Wong, W.-K., Wong, W.-Y., Choi, C.Y., Kwong, D.W.J. *et al.* Synthesis, characterization, singlet-oxygen photogeneration, DNA photocleavage and two-photon-absorption properties of some (4-cyanophenyl) porphyrins. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2009**, 922-928 (2009).
8. Tanito, M., Ogawa, Y., Yoshida, Y., Ohira, A., Niki, E. & Kinumi, T. Overoxidation of peroxiredoxins in vivo in cultured human umbilical vein endothelial cells and in damaging light-exposed mouse retinal tissues. *Neurosci. Lett.* **437**, 33-37 (2008).
9. Cronin, T., Raffelsberger, W., Lee-Rivera, I., Jaillard, C., Niepon, M.L., Kinzel, B. *et al.* The disruption of the rod-derived cone viability gene leads to photoreceptor dysfunction and susceptibility to oxidative stress. *Cell Death Differ.* **17**, 1199-1210 (2010).
10. Shinde, V.M., Sizova, O.S., Lin, J.H., LaVail, M.M. & Gorbatyuk, M.S. ER stress in retinal degeneration in S334ter Rho rats. in *PLoS ONE* Vol. 7 e33266 (Public Library of Science, 2012).
11. Hu, H. & Yang, W. Development and application of ab initio QM/MM methods for mechanistic simulation of reactions in solution and in enzymes. *J. Mol. Struct.: THEOCHEM* **898**, 17-30 (2009).
12. Senn, H.M. & Thiel, W. QM/MM methods for biomolecular systems. *Angew. Chem., Int. Ed.* **48**, 1198-1229 (2009).
13. Altun, A., Yokoyama, S. & Morokuma, K. Quantum mechanical/molecular mechanical studies on spectral tuning mechanisms of visual pigments and other photoactive proteins. *Photochem. Photobiol.* **84**, 845-854 (2008).
14. van der Kamp, M.W., Shaw, K.E., Woods, C.J. & Mulholland, A.J. Biomolecular simulation and modelling: status, progress and prospects. *J. R. Soc. Interface* **5**, S173-S190 (2008).
15. Okada, T., Sugihara, M., Bondar, A.-N., Elstner, M., Entel, P. & Buss, V. The retinal conformation and its environment in rhodopsin in light of a new 2.2 Å crystal structure. *J. Mol. Biol.* **342**, 571-583 (2004).
16. Röhrig, U.F., Guidoni, L. & Rothlisberger, U. Early steps of the intramolecular signal transduction in rhodopsin explored by molecular dynamics simulations. *Biochemistry* **41**, 10799-10809 (2002).

17. Okada, T., Ernst, O.P., Palczewski, K. & Hofmann, K.P. Activation of rhodopsin: new insights from structural and biochemical studies. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 318-324 (2001).
18. Altun, A., Yokoyama, S. & Morokuma, K. Spectral tuning in visual pigments: an ONIOM (QM:MM) study on bovine rhodopsin and its mutants. *J. Phys. Chem. B* **112**, 6814-6827 (2008).
19. Tsutsui, K. & Shichida, Y. Multiple functions of Schiff base counterion in rhodopsins. *Photochem. Photobiol. Sci.* **9**, 1426-1434 (2010).
20. Tsutsui, K., Imai, H. & Shichida, Y. Photoisomerization efficiency in UV-absorbing visual pigments: protein-directed isomerization of an unprotonated retinal Schiff base. *Biochemistry* **46**, 6437-6445 (2007).
21. Weingart, O., Altoe, P., Stenta, M., Bottoni, A., Orlandi, G. & Garavelli, M. Product formation in rhodopsin by fast hydrogen motions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **13**, 3645-3648 (2011).
22. Buss, V., Weingart, O. & Sugihara, M. Fast photoisomerization of a rhodopsin model-an ab initio molecular dynamics study. *Angew. Chem., Int. Ed.* **39**, 2784-2786 (2000).
23. Weingart, O. The twisted C11-C12 bond of the rhodopsin chromophore - a photochemical hot spot. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 10618-10619 (2007).
24. Garriga, P., Liu, X. & Khorana, H.G. Structure and function in rhodopsin: correct folding and misfolding in point mutants at and in proximity to the site of the retinitis pigmentosa mutation Leu-125 -> Arg in the transmembrane helix C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 4560-4564 (1996).
25. Liu, X., Garriga, P. & Khorana, H.G. Structure and function in rhodopsin: correct folding and misfolding in two point mutants in the intradiscal domain of rhodopsin identified in retinitis pigmentosa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 4554-4559 (1996).
26. Andres, A., Garriga, P. & Manyosa, J. Altered functionality in rhodopsin point mutants associated with retinitis pigmentosa. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **303**, 294-301 (2003).
27. Rakoczy, E.P., Kiel, C., McKeone, R., Stricher, F. & Serrano, L. Analysis of disease-linked rhodopsin mutations based on structure, function, and protein stability calculations. *J. Mol. Biol.* **405**, 584-606 (2011).
28. Fellingine, A., Seeber, M., Rao, F. & Fanelli, F. Computational screening of rhodopsin mutations associated with retinitis pigmentosa. *J. Chem. Theory Comput.* **5**, 2472-2485 (2009).
29. Aguila, M., Toledo, D., Morillo, M., Dominguez, M., Vaz, B., Alvarez, R. *et al.* Structural coupling of 11-cis-7-methyl-retinal and amino acids at the ligand binding pocket of rhodopsin. *Photochem. Photobiol.* **85**, 485-493 (2009).
30. Ryazantsev, M.N., Altun, A. & Morokuma, K. Color tuning in rhodopsins: the origin of the spectral shift between the chloride-bound and anion-free forms of halorhodopsin. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 5520-5523 (2012).
31. Wanko, M., Hoffmann, M., Strodel, P., Koslowski, A., Thiel, W., Neese, F. *et al.* Calculating absorption shifts for retinal proteins: computational challenges. *J. Phys. Chem. B* **109**, 3606-3615 (2005).
32. Grimme, S. & Waletzke, M. A combination of Kohn-Sham density functional theory and multi-reference configuration interaction methods. *J. Chem. Phys.* **111**, 5645-5655 (1999).

-
33. Levine, B.G., Ko, C., Quenneville, J. & Martinez, T.J. Conical intersections and double excitations in time-dependent density functional theory. *Mol. Phys.* **104**, 1039-1051 (2006).
34. Söderhjelm, P., Husberg, C., Strambi, A., Olivucci, M. & Ryde, U. Protein influence on electronic spectra modeled by multipoles and polarizabilities. *J. Chem. Theory Comput.* **5**, 649-658 (2009).
35. Send, R., Kaila, V.R.I. & Sundholm, D. Benchmarking the approximate second-order coupled-cluster method on biochromophores. *J. Chem. Theory Comput.* **7**, 2473-2484 (2011).
36. Hasegawa, J.-y., Fujimoto, K.J. & Nakatsuji, H. Color tuning in photofunctional proteins. *ChemPhysChem*. **12**, 3106-3115 (2011).
37. Laricheva, E.N., Gozem, S., Rinaldi, S., Melaccio, F., Valentini, A. & Olivucci, M. Origin of fluorescence in 11-cis locked bovine rhodopsin. *J. Chem. Theory Comput.* **8**, 2559-2563 (2012).
38. Iannaccone, A., Man, D., Waseem, N., Jennings, B.J., Ganapathiraju, M., Gallaher, K. *et al.* Retinitis Pigmentosa associated with rhodopsin mutations: correlation between phenotypic variability and molecular effects. *Vis. Res.* **46** 4556-4567 (2006).
39. Liu, J., Liu, M.Y., Nguyen, J.B., Bhagat, A., Mooney, V. & Yan, E.C.Y. Thermal decay of rhodopsin: role of hydrogen bonds in thermal isomerization of 11-cis retinal in the binding site and hydrolysis of protonated schiff base. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 8750-8751 (2009).
40. Liu, M.Y., Liu, J. & Yan, E.C.Y. A pathogenic mechanism of retinitis pigmentosa: thermal isomerization and stability of rhodopsin. *Abstracts, 36th Northeast Regional Meeting of the American Chemical Society, Hartford, CT, United States, October 7-10 NERM-326* (2009).
41. Retina International's Scientific Newsletter: Databank of the International Retinitis Pigmentosa Association (IRPA). <http://www.retina-international.com/sci-news/rhomut.htm> (acceso Feb 28, 2007).
42. Menon, S.T., Han, M. & Sakmar, T.P. Rhodopsin: structural basis of molecular physiology. *Physiol. Rev.* **81**, 1659-1688 (2001).
43. Travis, G.H., Golczak, M., Moise, A.R. & Palczewski, K. Diseases caused by defects in the visual cycle: retinoids as potential therapeutic agents. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **47**, 469-512 (2007).
44. Rico, J.F., López, R., Ema, I. & Ramírez, G. Chemical notions from the electron density. *J. Chem. Theory Comput.* **1**, 1083-1095 (2005).
45. Hernández-Rodríguez, E.W., Montero-Alejo, A.L., López, R., Sánchez-García, E., Montero-Cabrera, L.A. & García de la Vega, J.M. Electron density deformations provide new insights into the spectral shift of rhodopsins. *J. Comput. Chem.* **34**, 2460-2471 (2013).
46. Hernández-Rodríguez, E.W., Montero-Alejo, A.L., López, R., Sánchez-García, E., Montero-Cabrera, L.A. & García de la Vega, J.M. (2013) Inside Cover, Volume 34, Issue 28. *J. Comput. Chem.*, 34: iii-iv. doi: 10.1002/jcc.23442.
47. Hernández-Rodríguez, E.W., Sánchez-García, E., Crespo-Otero, R., Montero-Alejo, A.L., Montero, L.A. & Thiel, W. Understanding rhodopsin mutations linked to the retinitis pigmentosa disease: a QM/MM and DFT/MRCI study. *J. Phys. Chem. B* **116**, 1060-1076 (2012).

48. Padrón-García, J.A., Crespo-Otero, R., Hernández-Rodríguez, E.W., Garriga, P., Montero, L.A. & García-Pineiro, J.C. Patterns of retinal light absorption related to retinitis pigmentosa mutants from in silico model structures of rhodopsin. *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.* **57**, 392-399 (2004).
49. Roddy, G.W., Rosa Jr, R.H., Youn Oh, J., Ylostalo, J.H., Bartosh, T.J., Choi, H. *et al.* Stanniocalcin-1 rescued photoreceptor degeneration in two rat models of inherited retinal degeneration. *Mol. Ther.* **20**, 788-797 (2012).
50. Punzo, C., Kornacker, K. & Cepko, C.L. Stimulation of the insulin/mTOR pathway delays cone death in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Nat. Neurosci.* **12**, 44-52 (2009).
51. Punzo, C., Xiong, W. & Cepko, C.L. Loss of daylight vision in retinal degeneration: are oxidative stress and metabolic dysregulation to blame? *J. Biol. Chem.* **287**, 1642-1648 (2012).
52. Organisciak, D.T., Darrow, R.M., Barsalou, L., Kutty, R.K. & Wiggert, B. Susceptibility to retinal light damage in transgenic rats with rhodopsin mutations. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **44**, 486-492 (2003).
53. Sancho-Pelluz, J., Arango-Gonzalez, B., Kustermann, S., Romero, F., van Veen, T., Zrenner, E. *et al.* Photoreceptor cell death mechanisms in inherited retinal degeneration. *Mol. Neurobiol.* **38**, 253-269 (2008).
54. Carmody, R.J. & Cotter, T.G. Oxidative stress induces caspase-independent retinal apoptosis in vitro. *Cell Death Differ.* **7**, 282-291 (2000).
55. Miranda, M., Arnal, E., Ahuja, S., Alvarez-Nölting, R., López-Pedrajas, R., Ekström, P. *et al.* Antioxidants rescue photoreceptors in rd1 mice: relationship with thiol metabolism. *Free Rad. Biol. Med.* **48**, 216-222 (2010).
56. Athanasiou, D., Aguilà, M., Bevilacqua, D., Novoselov, S.S., Parfitt, D.A. & Cheetham, M.E. The cell stress machinery and retinal degeneration. *FEBS Lett.* **587**, 2008-2017 (2013).
57. Mendes, H.F., Van Der Spuy, J., Chapple, J.P. & Cheetham, M.E. Mechanisms of cell death in rhodopsin retinitis pigmentosa: implications for therapy. *Trends Mol. Med.* **11**, 177-185 (2005).
58. Stojanovic, A. & Hwa, J. Rhodopsin and retinitis pigmentosa: shedding light on structure and function. *Recept. Channels* **8**, 33-50 (2002).
59. Burns, M.E. & Arshavsky, V.Y. Beyond counting photons: trials and trends in vertebrate visual transduction. *Neuron* **48**, 387-401 (2005).
60. Chuang, J.-Z., Vega, C., Jun, W. & Sung, C.-H. Structural and functional impairment of endocytic pathways by retinitis pigmentosa mutant rhodopsin-arrestin complexes. *J. Clin. Invest.* **114**, 131-140 (2004).
61. Kennan, A., Aherne, A. & Humphries, P. Light in retinitis pigmentosa. *Trends Genet.* **21**, 103-110 (2005).
62. Sekharan, S., Sugihara, M. & Buss, V. Origin of spectral tuning in rhodopsin - it is not the binding pocket. *Angew. Chem., Int. Ed.* **46**, 269-271 (2007).
63. Palczewski, K. G protein-coupled receptor rhodopsin. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 743-767 (2006).
64. Ernst, O.P., Gramse, V., Kolbe, M., Hofmann, K.P. & Heck, M. Monomeric G protein-coupled receptor rhodopsin in solution activates its G protein transducin at the diffusion limit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 10859-10864 (2007).

-
65. Hubbard, R. Absorption spectrum of rhodopsin: 500 nm absorption band. *Nature* **221**, 432-435 (1969).
 66. Bravaya, K., Bochenkova, A., Granovsky, A. & Nemukhin, A. An opsin shift in rhodopsin: retinal S0-S1 excitation in protein, in solution, and in the gas phase. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 13035-13042 (2007).
 67. McBee, J.K., Palczewski, K., Baehr, W. & Pepperberg, D.R. Confronting complexity: the interlink of phototransduction and retinoid metabolism in the vertebrate retina. *Prog. Retinal Eye Res.* **20**, 469-529 (2001).
 68. Protein Data Bank. <http://www.pdb.org> (acceso Sept 1, 2009).
 69. Ridge, K.D., Ngo, T., Lee, S.S.J. & Abdulaev, N.G. Folding and assembly in rhodopsin. Effect of mutations in the sixth transmembrane helix on the conformation of the third cytoplasmic loop. *J. Biol. Chem.* **274**, 21437-21442 (1999).
 70. Breikers, G., Portier-VandeLuytgaarden, M.J.M., Bovee-Geurts, P.H.M. & DeGrip, W.J. Retinitis pigmentosa-associated rhodopsin mutations in three membrane-located cysteine residues present three different biochemical phenotypes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **297**, 847-853 (2002).
 71. Hwa, J., Reeves, P.J., Klein-Seetharaman, J., Davidson, F. & Khorana, H.G. Structure and function in rhodopsin: further elucidation of the role of the intradiscal cysteines, Cys-110, -185, and -187, in rhodopsin folding and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 1932-1935 (1999).
 72. Jäger, S., Han, M., Lewis, J.W., Szundi, I., Sakmar, T.P. & Kliger, D.S. Properties of early photolysis intermediates of rhodopsin are affected by glycine 121 and phenylalanine 261. *Biochemistry* **36**, 11804-11810 (1997).
 73. Sekharan, S. & Morokuma, K. QM/MM study of the structure, energy storage, and origin of the bathochromic shift in vertebrate and invertebrate bathorhodopsins. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 4734-4737 (2011).
 74. Watanabe, H.C., Mori, Y., Tada, T., Yokoyama, S. & Yamato, T. Molecular mechanism of long-range synergetic color tuning between multiple amino acid residues in conger rhodopsin. *Biophysics (Oxf)* **6**, 67-68 (2010).
 75. Altun, A., Yokoyama, S. & Morokuma, K. Mechanism of spectral tuning going from retinal in vacuo to bovine rhodopsin and its mutants: multireference ab initio quantum mechanics/molecular mechanics studies. *J. Phys. Chem. B* **112**, 16883-16890 (2008).
 76. Ma, Y., Rohlfing, M. & Molteni, C. Modeling the excited states of biological chromophores within many-body green's function theory. *J. Chem. Theory Comput.* **6**, 257-265 (2009).
 77. Coccia, E. & Guidoni, L. Quantum monte carlo study of the retinal minimal model C5H6NH2+. *J. Comput. Chem.* **33**, 2332-2339 (2012).
 78. Blomgren, F. & Larsson, S. Exploring the potential energy surface of retinal, a comparison of the performance of different methods. *J. Comput. Chem.* **26**, 738-742 (2005).
 79. Hoffmann, M., Wanko, M., Strodel, P., Koenig, P.H., Frauenheim, T., Schulten, K. *et al.* Color tuning in rhodopsins: the mechanism for the spectral shift between bacteriorhodopsin and sensory rhodopsin II. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 10808-10818 (2006).
 80. Rajamani, R., Lin, Y.-L. & Gao, J. The opsin shift and mechanism of spectral tuning in rhodopsin. *J. Comput. Chem.* **32**, 854-865 (2011).
 81. Fujimoto, K., Hayashi, S., Hasegawa, J.-y. & Nakatsuji, H. Theoretical studies on the color-tuning mechanism in retinal proteins. *J. Chem. Theory Comput.* **3**, 605-618 (2007).

-
82. Coto, P.B., Strambi, A., Ferre, N. & Olivucci, M. The color of rhodopsins at the ab initio multiconfigurational perturbation theory resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 17154-17159 (2006).
83. Strambi, A., Coto, P.B., Ferre, N. & Olivucci, M. Effects of water re-location and cavity trimming on the CASPT2//CASSCF/AMBER excitation energy of rhodopsin. *Theor. Chem. Acc.* **118**, 185-191 (2007).
84. Honig, B., Greenberg, A.D., Dinur, U. & Ebrey, T.G. Visual-pigment spectra: implications of the protonation of the retinal Schiff base. *Biochemistry* **15**, 4593-4599 (1976).
85. Bauernschmitt, R., Häser, M., Treutler, O. & Ahlrichs, R. Calculation of excitation energies within time-dependent density functional theory using auxiliary basis set expansions. *Chem. Phys. Lett.* **264**, 573-578 (1997).
86. van Gisbergen, S.J.A., Snijders, J. & Baerends, E.J. A density-functional theory study of frequency-dependent polarizabilities and van-der-waals dispersion coefficients for polyatomic-molecules. *J. Chem. Phys.* **103**, 9347-9354 (1995).
87. Jamorski, C., Casida, M.E. & Salahub, D.R. Dynamic polarizabilities and excitation spectra from a molecular implementation of time-dependent density-functional response theory: N-2 as a case study. *J. Chem. Phys.* **104**, 5134-5147 (1996).
88. Petersilka, M., Gossmann, U.J. & Gross, E.K.U. Excitation energies from time-dependent density-functional theory. *Phys. Rev. Lett.* **76**, 1212-1215 (1996).
89. Blumberger, J. Free energies for biological electron transfer from QM/MM calculation: method, application and critical assessment. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **10**, 5651-5667 (2008).
90. Kohn, W. & Holthausen, M.C. (eds.). *A Chemist's Guide to Density Functional Theory*, (Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany, 2001).
91. Dirac, P.A.M. Quantum mechanics of many-electron systems. *Proc. R. Soc. London, Ser. A* **123**, 714-733 (1929).
92. Slater, J.C. A simplification of the Hartree-Fock method. *Phys. Rev. A* **81**, 385-390 (1951).
93. Becke, A.D. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Phys. Rev. A* **38**, 3098-3100 (1988).
94. Lee, C., Yang, W. & Parr, R.G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B* **37**, 785-789 (1988).
95. Becke, A.D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.* **98**, 5648-5652 (1993).
96. Dreuw, A. & Head-Gordon, M. Single-reference ab initio methods for the calculation of excited states of large molecules. *Chem. Rev.* **105**, 4009-4037 (2005).
97. Kochendoerfer, G.G., Wang, Z., Oprian, D.D. & Mathies, R.A. Resonance raman examination of the wavelength regulation mechanism in human visual pigments. *Biochemistry* **36**, 6577-6587 (1997).
98. Röhrig, U.F., Guidoni, L. & Rothlisberger, U. Solvent and protein effects on the structure and dynamics of the rhodopsin chromophore. *Chem. Phys. Chem.* **6**, 1836-1847 (2005).
99. López, R., Rico, J.F., Ramírez, G., Ema, I. & Zorrilla, D. DAMQT: a package for the analysis of electron density in molecules. *Comput. Phys. Commun.* **180**, 1654-1660 (2009).
100. Chen, Y., Okano, K., Maeda, T., Chauhan, V., Golczak, M., Maeda, A. *et al.* Mechanism of all-trans-retinal toxicity with implications for stargardt disease and age-related macular degeneration. *J. Biol. Chem.* **287**, 5059-5069 (2012).

101. Choteau, F., Durand, G., Ranchon-Cole, I., Cercy, C. & Pucci, B. Cholesterol-based α -phenyl-N-tert-butyl nitron derivatives as antioxidants against light-induced retinal degeneration. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20**, 7405-7409 (2010).
102. Yang, L.-p., Wu, L.-m., Guo, X.-j., Li, Y. & Tso, M.O.M. Endoplasmic reticulum stress is activated in light-induced retinal degeneration. *J. Neurosci. Res.* **86**, 910-919 (2008).
103. Rózanowska, M. & Sarna, T. Light-induced damage to the retina: role of rhodopsin chromophore revisited. *Photochem. Photobiol.* **81**, 1305-1330 (2005).
104. Tanaka, J., Nakanishi, T., Ogawa, K., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Shimoda, H. *et al.* Purple rice extract and anthocyanidins of the constituents protect against light-induced retinal damage in vitro and in vivo. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 528-536 (2011).
105. Vlachantoni, D., Bramall, A.N., Murphy, M.P., Taylor, R.W., Shu, X., Tulloch, B. *et al.* Evidence of severe mitochondrial oxidative stress and a protective effect of low oxygen in mouse models of inherited photoreceptor degeneration. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 322-335 (2011).
106. Del Valle, L.J., Ramon, E., Bosch, L., Manyosa, J. & Garriga, P. Specific isomerization of rhodopsin-bound 11-cis-retinal to all-trans-retinal under thermal denaturation. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**, 2532-2537 (2003).
107. Glickman, R.D. Ultraviolet phototoxicity to the retina. *Eye & Contact Lens* **37**, 196-205 (2011).
108. Schweitzer, C. & Schmidt, R. Physical mechanisms of generation and deactivation of singlet oxygen. *Chem. Rev.* **103**, 1685-1757 (2003).
109. Gallavardin, T., Armagnat, C., Maury, O., Baldeck, P.L., Lindgren, M., Monnereau, C. *et al.* An improved singlet oxygen sensitizer with two-photon absorption and emission in the biological transparency window as a result of ground state symmetry-breaking. *Chem. Commun.* **48**, 1689-1691 (2012).
110. Breitenbach, T., Ogilby, P.R. & Lambert, J.D.C. Effect of intracellular photosensitized singlet oxygen production on the electrophysiological properties of cultured rat hippocampal neurons. *Photochem. Photobiol. Sci.* **9**, 1621-1633 (2010).
111. Nielsen, C.B., Arnbjerg, J., Johnsen, M., Jørgensen, M. & Ogilby, P.R. Molecular tuning of phenylene-vinylene derivatives for two-photon photosensitized singlet oxygen production. *J. Org. Chem.* **74**, 9094-9104 (2009).
112. DeRosa, M.C. & Crutchley, R.J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coord. Chem. Rev.* **233-234**, 351-371 (2002).
113. Makky, A., Michel, J.P., Maillard, P. & Rosilio, V. Biomimetic liposomes and planar supported bilayers for the assessment of glycodendrimeric porphyrins interaction with an immobilized lectin. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1808**, 656-666 (2011).
114. Salice, P., Arnbjerg, J., Pedersen, B.W., Toftegaard, R., Beverina, L., Pagani, G.A. *et al.* Photophysics of squaraine dyes: role of charge-transfer in singlet oxygen production and removal. *J. Phys. Chem. A* **114**, 2518-2525 (2010).
115. Ogilby, P.R. Singlet oxygen: there is indeed something new under the sun. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 3181-3209 (2010).
116. Osborne, N.N., Li, G.-Y., Ji, D., Mortiboys, H.J. & Jackson, S. Light affects mitochondria to cause apoptosis to cultured cells: possible relevance to ganglion cell death in certain optic neuropathies. *Neurochem. Res.* **105**, 2013-2028 (2008).

117. Loginova, M.Y., Rostovtseva, Y.V., Feldman, T.B. & Ostrovsky, M.A. Light damaging action of all-*trans*-retinal and its derivatives on rhodopsin molecules in the photoreceptor membrane. *Biochemistry* **73**, 130-138 (2008).
118. Mainster, M.A. Violet and blue light blocking intraocular lenses: photoprotection versus photoreception. *Br. J. Ophthalmol.* **90**, 784-792 (2006).
119. Yamauchi, M., Tsuruma, K., Imai, S., Nakanishi, T., Umigai, N., Shimazawa, M. *et al.* Crocetin prevents retinal degeneration induced by oxidative and endoplasmic reticulum stresses via inhibition of caspase activity. *Eur. J. Pharmacol.* **650**, 110-119 (2011).
120. Edwards, K.H. & Gibson, G.A. Intraocular lens short wavelength light filtering. *Clin. Exp. Optom.* **93**, 390-399 (2010).
121. Boulton, M., Rózanowska, M. & Rózanowski, B. Retinal photodamage. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **64**, 144-161 (2001).
122. Roehlecke, C., Schumann, U., Ader, M., Knels, L. & Funk, R.H.W. Influence of blue light on photoreceptors in a live retinal explant system. *Mol. Vis.* **17**, 876-884 (2011).
123. Hui, S., Yi, L. & Fengling, Q.L. Effects of light exposure and use of intraocular lens on retinal pigment epithelial cells in vitro. *Photochem. Photobiol.* **85**, 966-969 (2009).
124. Sokolov, V.S., Sokolenko, E.A., Sokolov, A.V., Dontsov, A.E., Chizmadzhev, Y.A. & Ostrovsky, M.A. Interaction of pyridinium bis-retinoid (A2E) with bilayer lipid membranes. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **86**, 177-185 (2007).
125. Noell, W.K., Walker, V.S., Kang, B.S. & Berman, S. Retinal damage by light in rats. *Invest. Ophthalmol.* **5**, 450-473 (1966).
126. Noell, W.K. Possible mechanisms of photoreceptor damage by light in mammalian eyes. *Vis. Res.* **20**, 1163-1171 (1980).
127. Osborne, N.N., Kamalden, T.A., Majid, A.S.A., del Olmo-Aguado, S., Manso, A.G. & Ji, D. Light effects on mitochondrial photosensitizers in relation to retinal degeneration. *Neurochem. Res.* **35**, 2027-2034 (2010).
128. Kaushal, S., Ridge, K.D. & Khorana, H.G. Structure and function in rhodopsin: the role of asparagine-linked glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 4024-4028 (1994).
129. Universal Protein Resource. <http://www.uniprot.org> (acceso Feb 28, 2007).
130. Wald, G. & Brown, P.K. Human Rhodopsin. *Science* **127**, 222-249 (1958).
131. Nathans, J. & Hogness, D.S. Isolation and nucleotide sequence of the gene encoding human rhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 4851-4855 (1984).
132. Rodriguez, R., Chinea, G., Lopez, N., Pons, T. & Vriend, G. Homology modeling, model and software evaluation: three related resources. *Bioinformatics* **14**, 523-528 (1998).
133. Altschul, S.F., Boguski, M.S., Gish, W. & Wootton, J.C. Basic local alignment search tool. *Nat. Genet.* **6**, 119-129 (1994).
134. ExPASy Molecular Biology Server. <http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/genomes/madanm/pre-s/swiss1.htm> (acceso Sept 1, 2009).
135. Šali, A. & Blundell, T.L. Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* **234**, 779-815 (1993).
136. Šali, A., Potterton, L., Yuan, F., van Vlijmen, H. & Karplus, M. Evaluation of comparative protein modeling by MODELLER. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **23**, 318-326 (1995).
137. Li, H., Robertson, A.D. & Jensen, J.H. Very fast empirical prediction and rationalization of protein pKa values. *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **61**, 704-721 (2005).
138. Chen, C., Jiang, Y. & Koutalos, Y. Dynamic behavior of rod photoreceptor disks. *Biophys. J.* **83**, 1403-1412 (2002).

139. Fahmy, K., Jager, F., Beck, M., Zvyaga, T.A., Sakmar, T.P. & Siebert, F. Protonation states of membrane-embedded carboxylic acid groups in rhodopsin and metarhodopsin II: a Fourier-transform infrared spectroscopy study of site-directed mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 10206-10210 (1993).
140. Yan, E.C.Y., Kazmi, M.A., De, S., Chang, B.S.W., Seibert, C., Marin, E.P. *et al.* Function of extracellular loop 2 in rhodopsin: glutamic acid 181 modulates stability and absorption wavelength of metarhodopsin II. *Biochemistry* **41**, 3620-3627 (2002).
141. Mollevanger, L.C.P.J., Kentgens, A.P.M., Pardoën, J.A., Courtin, J.M.L., Veeman, W.S., Lugtenburg, J. *et al.* High-resolution solid-state carbon-13 NMR study of carbons C-5 and C-12 of the chromophore of bovine rhodopsin. Evidence for a 6-s-cis conformation with negative-charge perturbation near C-12. *Eur. J. Biochem.* **163**, 9-14 (1987).
142. Han, M. & Smith, S.O. NMR constraints on the location of the retinal chromophore in rhodopsin and bathorhodopsin. *Biochemistry* **34**, 1425-1432 (1995).
143. Han, M. & Smith, S.O. NMR constraints on the location of the retinal chromophore in rhodopsin and bathorhodopsin. [Erratum to document cited in CA122:75001]. *Biochemistry* **36**, 7280 (1997).
144. Frähmcke, J.S., Wanko, M., Phatak, P., Mroginiski, M.A. & Elstner, M. The protonation state of Glu181 in rhodopsin revisited: interpretation of experimental data on the basis of QM/MM calculations. *J. Phys. Chem. B* **114**, 11338-11352 (2010).
145. Birge, R.R., Murray, L.P., Pierce, B.M., Akita, H., Balogh-Nair, V., Findsen, L.A. *et al.* Two-photon spectroscopy of locked-11-cis-rhodopsin: evidence for a protonated Schiff base in a neutral protein binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 4117-4121 (1985).
146. Sekharan, S. & Buss, V. Glutamic acid 181 is uncharged in dark-adapted visual rhodopsin. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 17220-17221 (2008).
147. Cai, K., Klein-Seetharaman, J., Farrens, D., Zhang, C., Altenbach, C., Hubbell, W.L. *et al.* Single-cysteine substitution mutants at amino acid positions 306-321 in rhodopsin, the sequence between the cytoplasmic end of helix VII and the palmitoylation sites: sulfhydryl reactivity and transducin activation reveal a tertiary structure. *Biochemistry* **38**, 7925-7930 (1999).
148. Phillips, J.C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E. *et al.* Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* **26**, 1781-1802 (2005).
149. Bowie, J.U., Luthy, R. & Eisenberg, D. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science* **253**, 164-170 (1991).
150. Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S. & Thornton, J.M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* **26**, 283-291 (1993).
151. Hooft, R.W.W., Vriend, G., Sander, C. & Abola, E.E. Errors in protein structures. *Nature* **381**, 272 (1996).
152. Brooks, B.R., Bruccoleri, R.E., Olafson, B.D., States, D.J., Swaminathan, S. & Karplus, M. CHARMM: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J. Comput. Chem.* **4**, 187-217 (1983).
153. MacKerell, A.D., Brooks, B., Brooks III, C.L., Nilsson, L., Roux, B., Won, Y. *et al.* in *The Encyclopedia of Computational Chemistry* (ed. P. v. R. Schleyer, P.R.S., N. L. Allinger, T. Clark, J. Gasteiger, P. Kollman, H. F. Schaefer III) 271-277 (John Wiley & Sons, Chichester, U.K., 1998).

154. Ryckaert, J.-P., Ciccotti, G. & Berendsen, H.J.C. Numerical integration of the Cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *J. Comput. Phys.* **23**, 327-341. (1977).
155. Jorgensen, W.L., Chandrasekhar, J., Madura, J.D., Impey, R.W. & Klein, M.L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **79**, 926-928 (1983).
156. Humphrey, W., Dalke, A. & Schulten, K. VMD - visual molecular dynamics. *J. Mol. Graphics* **14**, 33-38 (1996).
157. Fong, S.L., Tsin, A.T.C., Bridges, C.D.B. & Liou, G.I. Detergents for extraction of visual pigments: types, solubilization, and stability. *Methods Enzymol.* **81**, 133-140 (1982).
158. Saam, J., Tajkhorshid, E., Hayashi, S. & Schulten, K. Molecular dynamics investigation of primary photoinduced events in the activation of rhodopsin. *Biophys. J.* **83**, 3097-3112 (2002).
159. Grubmüller, H. & Groll, V. Solvate 1.0; Universidad de Munich. <http://www.mpibpc.mpg.de/home/grubmuller/downloads/solvate/index.html> (acceso Oct 11, 2010).
160. Essmann, U., Perera, L., Berkowitz, M.L., Darden, T., Lee, H. & Pedersen, L.G. A smooth particle mesh Ewald method. *J. Chem. Phys.* **103**, 8577-8593 (1995).
161. Babitzki, G., Denschlag, R. & Tavan, P. Polarization effects stabilize bacteriorhodopsin's chromophore binding pocket: a molecular dynamics study. *J. Phys. Chem. B* **113**, 10483-10495 (2009).
162. Sherwood, P., de Vries, A.H., Guest, M.F., Schreckenbach, G., Catlow, C.R.A., French, S.A. *et al.* QUASI: a general purpose implementation of the QM/MM approach and its application to problems in catalysis. *J. Mol. Struct.: THEOCHEM* **632**, 1-28 (2003).
163. ChemShell, a Computational Chemistry Shell. <http://www.chemshell.org> (acceso May 4, 2010).
164. Ahlrichs, R., Bär, M., Häser, M., Horn, H. & Kölmel, C. Electronic structure calculations on workstation computers: the program system turbomole. *Chem. Phys. Lett.* **162**, 165-169 (1989).
165. Smith, W. & Forester, T.R. DL-POLY_2.0: a general-purpose parallel molecular dynamics simulation package. *J. Mol. Graphics* **14**, 136-141 (1996).
166. MacKerell, A.D., Jr., Bashford, D., Bellott, M., Dunbrack, R.L., Evanseck, J.D., Field, M.J. *et al.* All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J. Phys. Chem. B* **102**, 3586-3616 (1998).
167. MacKerell, A.D., Jr., Feig, M. & Brooks, C.L., III. Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamics simulations. *J. Comput. Chem.* **25**, 1400-1415 (2004).
168. Bakowies, D. & Thiel, W. Hybrid models for combined quantum mechanical and molecular mechanical approaches. *J. Phys. Chem.* **100**, 10580-10594 (1996).
169. de Vries, A.H., Sherwood, P., Collins, S.J., Rigby, A.M., Rigutto, M. & Kramer, G.J. Zeolite structure and reactivity by combined quantum-chemical-classical calculations. *J. Phys. Chem. B* **103**, 6133-6141 (1999).
170. Antes, I. & Thiel, W. On the treatment of link atoms in hybrid methods. *ACS Symp. Ser.* **712**, 50-65 (1998).

-
171. Billeter, S.R., Turner, A.J. & Thiel, W. Linear scaling geometry optimization and transition state search in hybrid delocalized internal coordinates. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2**, 2177-2186 (2000).
172. Feller, S.E., Yin, D., Pastor, R.W. & MacKerell, A.D. Molecular dynamics simulation of unsaturated lipids at low hydration: parameterization and comparison with diffraction studies. *Biophys. J.* **73**, 2269-2279 (1997).
173. Yin, D. & Mackerell, A.D.J. Combined ab initio/empirical approach for optimization of Lennard-Jones parameters. *J. Comput. Chem.* **19**, 334-348 (1998).
174. Nina, M., Roux, B. & Smith, J.C. Functional interactions in bacteriorhodopsin: a theoretical analysis of retinal hydrogen bonding with water. *Biophys. J.* **68**, 25-39 (1995).
175. CHARMM Library. <http://www.charmm.org> (acceso May 4, 2010).
176. Gerenkamp, M. Entwicklung und anwendung quantenchemischer methoden zur berechnung komplexer chemischer systeme. *Ph. D. Thesis, Universität Münster* (2005).
177. Silva-Junior, M.R., Schreiber, M., Sauer, S.P.A. & Thiel, W. Benchmarks for electronically excited states: time-dependent density functional theory and density functional theory based multireference configuration interaction. *J. Chem. Phys.* **129**, 104103 (2008).
178. Frisch, M.J., et al. Gaussian 09, Revision A.02; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT. (2009).
179. Moraes, T.F. & Borges, I. Nuclear fukui functions and the deformed atoms in molecules representation of the electron density: application to gas-phase RDX (hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5- triazine) electronic structure and decomposition. *Int. J. Quantum Chem.* **111**, 1444-1452 (2011).
180. Ferro, V.R., López, R., Omar, S. & De La Vega, J.M.G. On the molecular electron structure of three phosphinine-containing macrocycles. *J. Comput. Chem.* **28**, 958-966 (2007).
181. Koopmans, T. Über die zuordnung von wellenfunktionen und eigenwerten zu den einzelnen elektronen eines atoms. *Physica* **1**, 104-113 (1934).
182. Wolfram Research, I. Mathematica Edition. Mathematica: 8.0 edn (Wolfram Research, Inc., Champaign, Illinois, 2010).
183. Laaksonen, L. A graphics program for the analysis and display of molecular dynamics trajectories. *J. Mol. Graphics* **10**, 33-34 (1992).
184. Bergman, D.L., Laaksonen, L. & Laaksonen, A. Visualization of solvation structures in liquid mixtures. *J. Mol. Graphics Modell.* **15**, 301-306 (1997).
185. gOpenMol. <http://www.csc.fi/gopenmol/> (acceso May 6, 2012).
186. Huber, T., Botelho, A.V., Beyer, K. & Brown, M.F. Membrane model for the G-protein-coupled receptor rhodopsin: hydrophobic interface and dynamical structure. *Biophys. J.* **86**, 2078-2100 (2004).
187. Kelly, J.W. & Balch, W.E. The integration of cell and chemical biology in protein folding. *Nat. Chem. Biol.* **2**, 224-227 (2006).
188. Connelly, S., Choi, S., Johnson, S.M., Kelly, J.W. & Wilson, I.A. Structure-based design of kinetic stabilizers that ameliorate the transthyretin amyloidoses. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **20**, 54-62 (2010).
189. Gascon, J.A. & Batista, V.S. QM/MM study of energy storage and molecular rearrangements due to the primary event in vision. *Biophys. J.* **87**, 2931-2941 (2004).
190. Sekharan, S., Altun, A. & Morokuma, K. Photochemistry of visual pigment in a G(q) protein-coupled receptor (GPCR)—insights from structural and spectral tuning studies on squid rhodopsin. *Chem.–Eur. J.* **16**, 1744-1749 (2010).

191. Röhrig, U.F., Guidoni, L., Laio, A., Frank, I. & Rothlisberger, U. A molecular spring for vision. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 15328-15329 (2004).
192. Sekharan, S., Altun, A. & Morokuma, K. QM/MM study of dehydro and dihydro beta-ionone retinal analogues in squid and bovine rhodopsins: implications for vision in salamander rhodopsin. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 15856-15859 (2010).
193. Sugihara, M., Buss, V., Entel, P., Elstner, M. & Frauenheim, T. 11-cis-retinal protonated schiff base: influence of the protein environment on the geometry of the rhodopsin chromophore. *Biochemistry* **41**, 15259-15266 (2002).
194. Andersen, L.H., Nielsen, I.B., Kristensen, M.B., El Ghazaly, M.O.A., Haacke, S., Nielsen, M.B. *et al.* Absorption of schiff-base retinal chromophores in vacuo. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 12347-12350 (2005).
195. Rajput, J., Rahbek, D.B., Andersen, L.H., Hirshfeld, A., Sheves, M., Altoè, P. *et al.* Probing and modeling the absorption of retinal protein chromophores in vacuo. *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 1790-1793 (2010).
196. Matsuura, A., Sato, H., Houjou, H., Saito, S., Hayashi, T. & Sakurai, M. Accurate evaluation of the absorption maxima of retinal proteins based on a hybrid QM/MM method. *J. Comput. Chem.* **27**, 1623-1630 (2006).
197. Gascon, J.A., Sproviero, E.M. & Batista, V.S. QM/MM study of the NMR spectroscopy of the retinyl chromophore in visual rhodopsin. *J. Chem. Theory Comput.* **1**, 674-685 (2005).
198. Andruniow, T. & Olivucci, M. How does the relocation of internal water affect resonance raman spectra of rhodopsin? An insight from CASSCF/Amber calculations. *J. Chem. Theory Comput.* **5**, 3096-3104 (2009).
199. Altun, A., Morokuma, K. & Yokoyama, S. H-bond network around retinal regulates the evolution of ultraviolet and violet vision. *ACS Chem. Biol.* **6**, 775-780 (2011).
200. Sekharan, S., Yokoyama, S. & Morokuma, K. Quantum mechanical/molecular mechanical structure, enantioselectivity, and spectroscopy of hydroxyretinals and insights into the evolution of color vision in small white butterflies. *J. Phys. Chem. B* **115**, 15380-15388 (2011).
201. Altun, A., Yokoyama, S. & Morokuma, K. Color tuning in short wavelength-sensitive human and mouse visual pigments: ab initio quantum mechanics/molecular mechanics studies. *J. Phys. Chem. A* **113**, 11685-11692 (2009).
202. Jones, L.C. & Taylor, L.W. Far ultraviolet absorption spectra of unsaturated and aromatic hydrocarbons. *Anal. Chem.* **27**, 228-237 (1955).
203. Christensen, R.L., Faksh, A., Meyers, J.A., Samuel, I.D.W., Wood, P., Schrock, R.R. *et al.* Optical spectroscopy of long polyenes. *J. Phys. Chem. A* **108**, 8229-8236 (2004).
204. Ogilby, P.R. Singlet oxygen: there is still something new under the sun, and it is better than ever. *Photochem. Photobiol. Sci.* **9**, 1543-1560 (2010).
205. Feis, A., Wegewijs, B., Wolfgang, G. & Braslavsky, S.E. Role of the triplet state in retinal photoisomerization as studied by laser-induced optoacoustic spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* **101**, 7620-7627 (1997).
206. Washington, I., Brooks, C., Turro, N.J. & Nakanishi, K. Porphyrins as photosensitizers to enhance night vision. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 9892-9893 (2004).
207. Nagata, J.Y., Hioka, N., Kimura, E., Batistela, V.R., Terada, R.S., Graciano, A.X. *et al.* Antibacterial photodynamic therapy for dental caries: evaluation of the photosensitizers used and light source properties. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **9**, 122-131 (2012).

-
208. Pedersen, B.W., Sinks, L.E., Breitenbach, T., Schack, N.B., Vinogradov, S.A. & Ogilby, P.R. Single cell responses to spatially controlled photosensitized production of extracellular singlet oxygen. *Photochem. Photobiol.* **87**, 1077-1091 (2011).
209. Kim, J.E., Tauber, M.J. & Mathies, R.A. Wavelength dependent cis-trans isomerization in vision. *Biochemistry* **40**, 13774-13778 (2001).
210. Roberts, J.E. Ocular phototoxicity. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **64**, 136-143 (2001).
211. Chin, K.K., Trevithick-Sutton, C.C., McCallum, J., Jockusch, S., Turro, N.J., Scaiano, J.C. *et al.* Quantitative determination of singlet oxygen generated by excited state aromatic amino acids, proteins, and immunoglobulins. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 6912-6913 (2008).
212. Bulina, M., Chudakov, D., Britanova, O., Yanushevich, Y., Staroverov, D., Chepurnykh, T. *et al.* A genetically encoded photosensitizer. *Nat. Biotechnol.* **24**, 95-99 (2006).
213. Organisciak, D.T. & Winkler, B.S. Retinal light damage: practical and theoretical considerations. *Prog. Ret. Eye Res.* **13**, 1-29 (1994).
214. LaVail, M.M., Gorrin, G.M., Repaci, M.A., Thomas, L.A. & Ginsberg, H.M. Genetic regulation of light damage to photoreceptors. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **28**, 1043-1048 (1987).
215. Ranchon, I., LaVail, M.M., Kotake, Y. & Anderson, R.E. Free radical trap phenyl-N-tert-butyl nitron protects against light damage but does not rescue P23H and S334ter rhodopsin transgenic rats from inherited retinal degeneration. *J. Neurosci.* **23**, 6050-6057 (2003).
216. Demontis, G.C., Longoni, B. & Marchiafava, P.L. Molecular steps involved in light-induced oxidative damage to retinal rods. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43**, 2421-2427 (2002).
217. Olchawa, M., Szewczyk, G., Zaręba, M., Piłat, A., Bzowska, M., Mikołajczyk, T. *et al.* Sublethal photodynamic damage to ARPE-19 cells transiently inhibits their phagocytic activity. *Photochem. Photobiol.* **86**, 772-780 (2010).
218. Arnbjerg, J., Johnsen, M., Nielsen, C.B., Jørgensen, M. & Ogilby, P.R. Effect of sensitizer protonation on singlet oxygen production in aqueous and nonaqueous media. *J. Phys. Chem. A* **111**, 4573-4583 (2007).
219. Send, R. & Sundholm, D. Stairway to the conical intersection: a computational study of the retinal isomerization. *J. Phys. Chem. A* **111**, 8766-8773 (2007).
220. Komeima, K., Usui, S., Shen, J., Rogers, B.S. & Campochiaro, P.A. Blockade of neuronal nitric oxide synthase reduces cone cell death in a model of retinitis pigmentosa. *Free Rad. Biol. Med.* **45**, 905-912 (2008).

ANEXOS

Figura A1. Alineamiento de la secuencia de la rodopsina del humano (*Homo Sapiens*) con aquella del sistema bovino (*Bos Taurus*) de partida. Se resaltan en gris y con asteriscos (*) los residuos aminoacídicos idénticos entre secuencias. El valor de identidad de secuencia fue de 93,4 % entre las estructuras primarias con una extensión de 348 residuos aminoacídicos representados mediante el código de una letra para cada rodopsina.

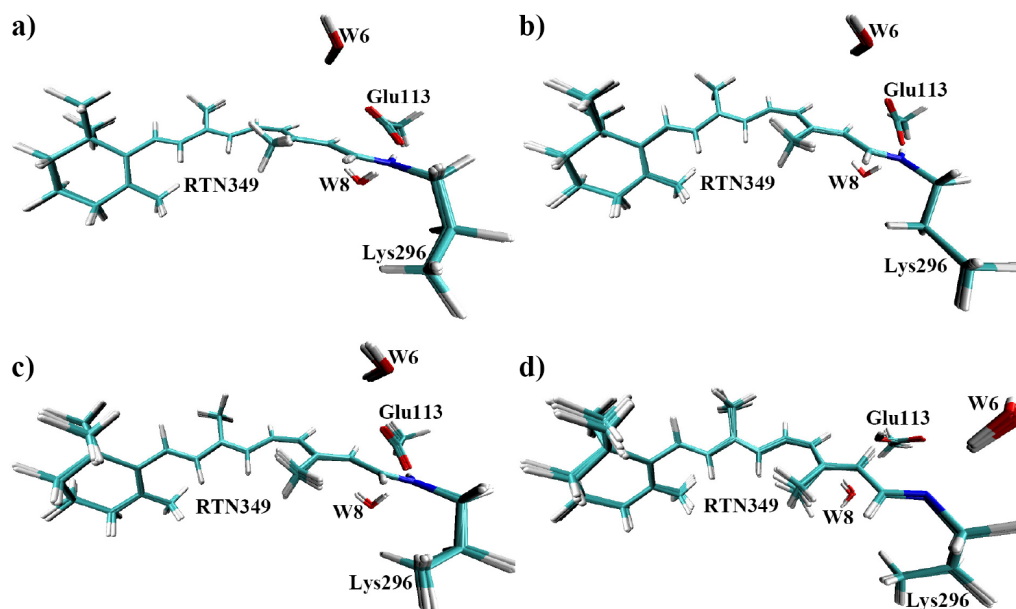


Figura A2. Superposición de las regiones QM de las rodopsinas (a) bWT; (b) hWT; (c) hM207R; y (d) hS186W a partir de cuatro estructuras de cada sistema. Modelo **Rho₁**: proteína explícita en ambiente acuoso, la región QM incluye 11-*cis*-retinal, parte de los residuos aminoacídicos Lys296 y Glu113, y dos moléculas de agua (W6 y W8).

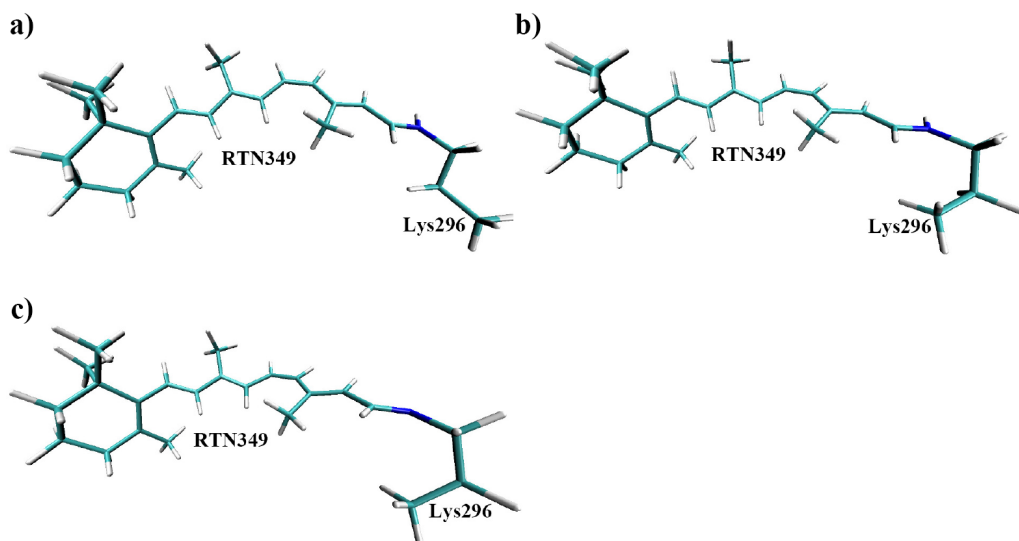


Figura A3. Regiones QM de las rodopsinas (a) hWT; (b) hM207R; y (c) hS186W a partir de una estructura de cada sistema. Modelo **Rho₂**: la región QM solamente contiene 11-*cis*-retinal y parte de Lys296. Todas las cargas puntuales MM son ajustadas a cero excepto aquellas del residuo aminoacídico Glu113.

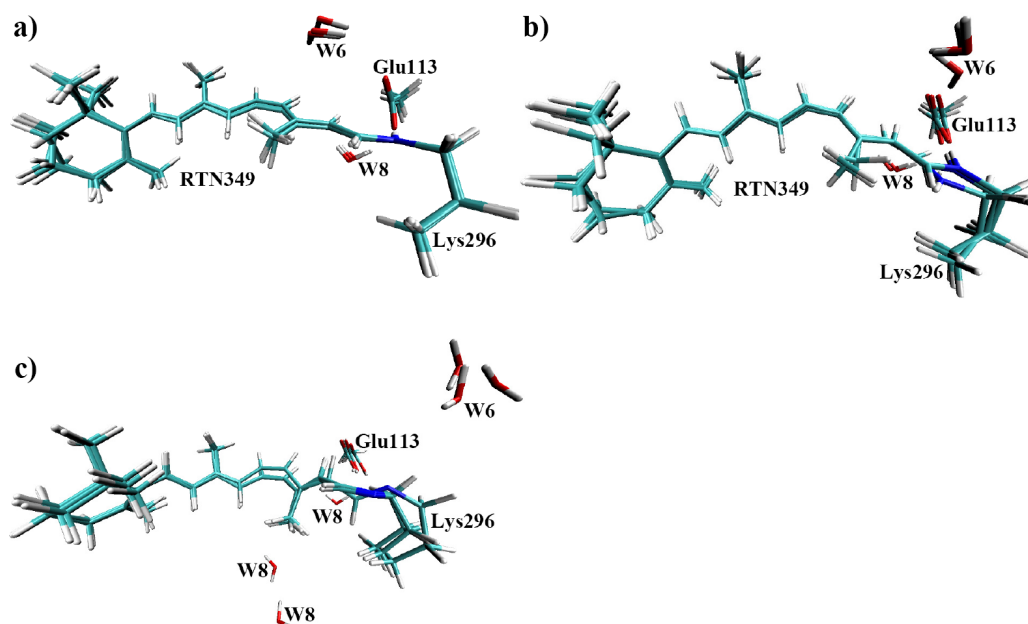


Figura A4. Superposición de las regiones QM de las rodopsinas (a) bWT; (b) hWT; y (c) hS186W a partir de tres estructuras de cada sistema. Modelo **Rho₃**: proteína en una bicapa lipídica solvatada de palmitoil—oleoil—fosfatidil—colina, se usó la misma región QM como en **Rho₁**. Estas estructuras fueron obtenidas a partir de simulaciones sin restricciones usadas para identificar grandes desviaciones estructurales de las rodopsinas con respecto a la estructura cristal.

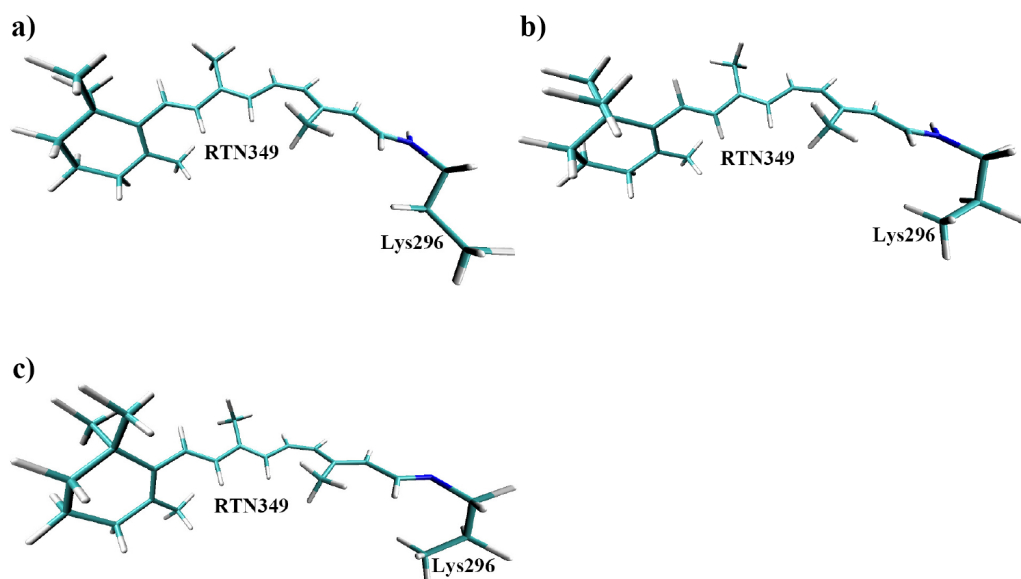


Figura A5. Regiones QM de las rodopsinas (a) hWT; (b) hM207R; y (c) hS186W a partir de una estructura de cada sistema. Modelo **Rho₄**: se usa el modelo **Rho₁** pero excluyendo al residuo Glu113 (contraión) y a las moléculas de agua de la región QM.

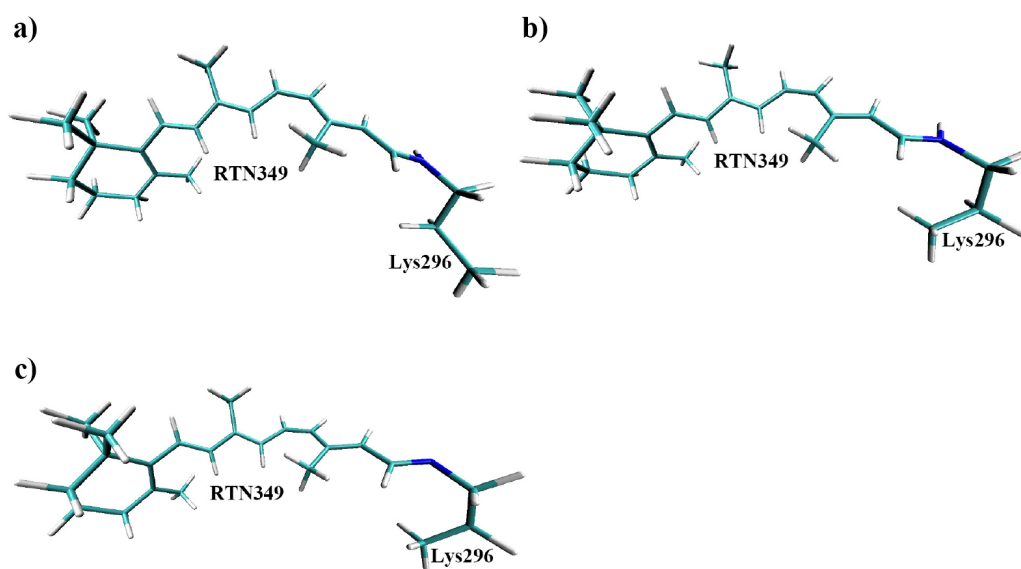


Figura A6. Regiones QM de las rodopsinas (a) hWT; (b) hM207R; y (c) hS186W a partir de una estructura de cada sistema. Modelo **Rho₅**: se usa el modelo **Rho₁** pero la región QM solamente contiene 11-*cis*-retinal y parte de Lys296. Todas las cargas puntuales MM son retenidas excepto aquellas del residuo aminoácido Glu113.

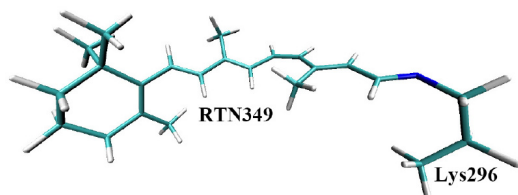


Figura A7. Región QM de la rodopsina hS186W para el modelo **Rho₆**: se usa el modelo el **Ret_{gas}** pero aplicado a hS186W.

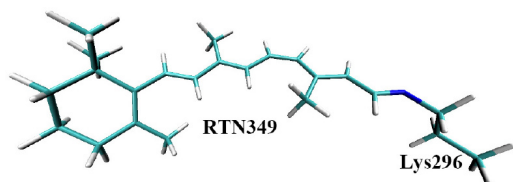


Figura A8. Región QM de la rodopsina hWT a partir del modelo **Ret_{gas}**: la región QM solamente contiene 11-*cis*-retinal y parte del residuo aminoácido Lys296. Todas las cargas puntuales MM fueron ajustadas a cero para la estructura hWT y la base de Schiff fue desprotonada en este modelo.

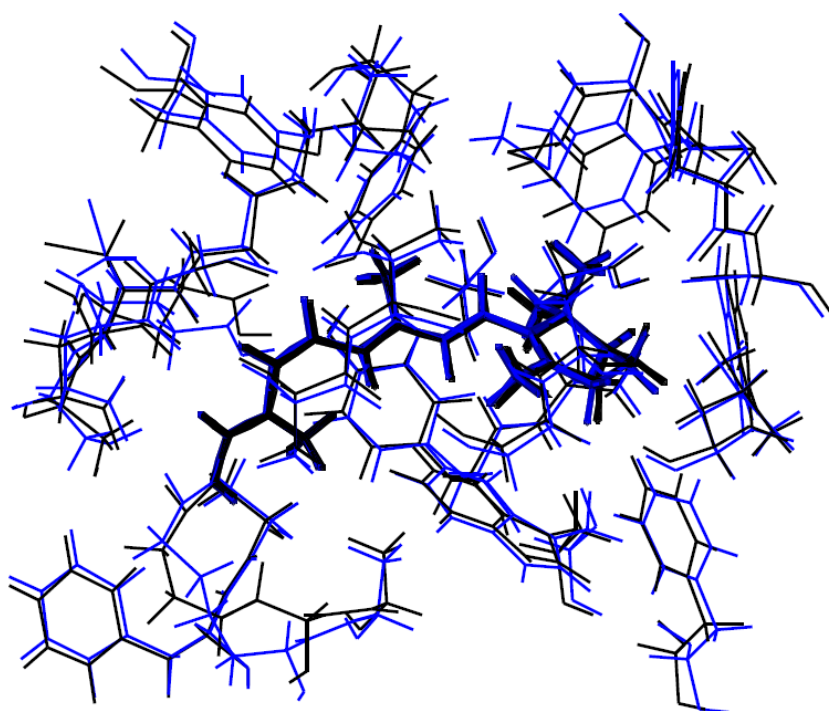


Figura A9. Superposición de los 27 residuos aminoacídicos y del cromóforo 11—*cis*—retinal de las rodopsinas bovina (bWT) y humana (hWT) normales dentro de una esfera de radio 4,5 Å con centro en el retinal. Se representa a bWT en negro y hWT en azul.

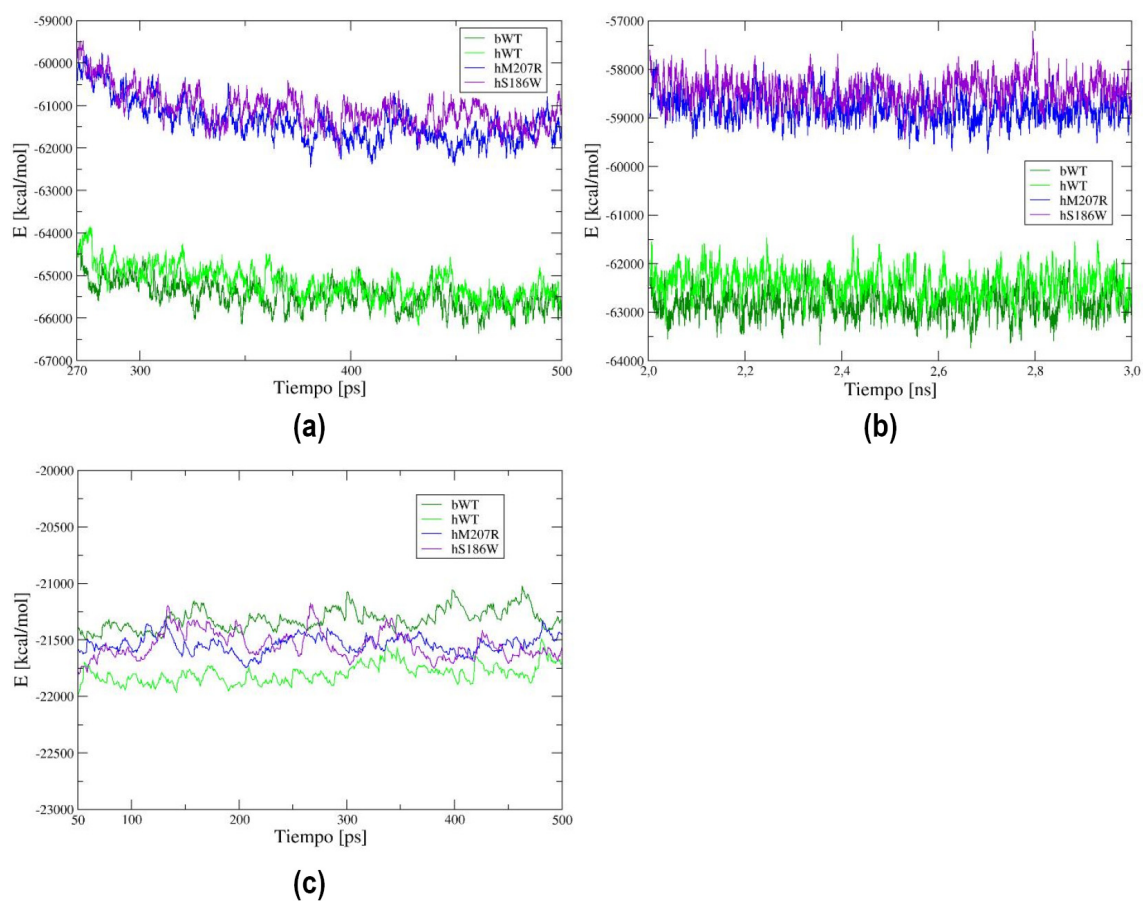


Figura A10. Evolución de las energías durante las simulaciones de dinámica molecular (MD): (a, b) con la proteína en bicapa lipídica solvatada (a) restringida (MD_2^R), (b) no restringida (MD_2^L); y (c) con la proteína solvatada (MD_1). bWT (verde oscuro), hWT (verde claro), hM207R (azul), y hS186W (violeta).

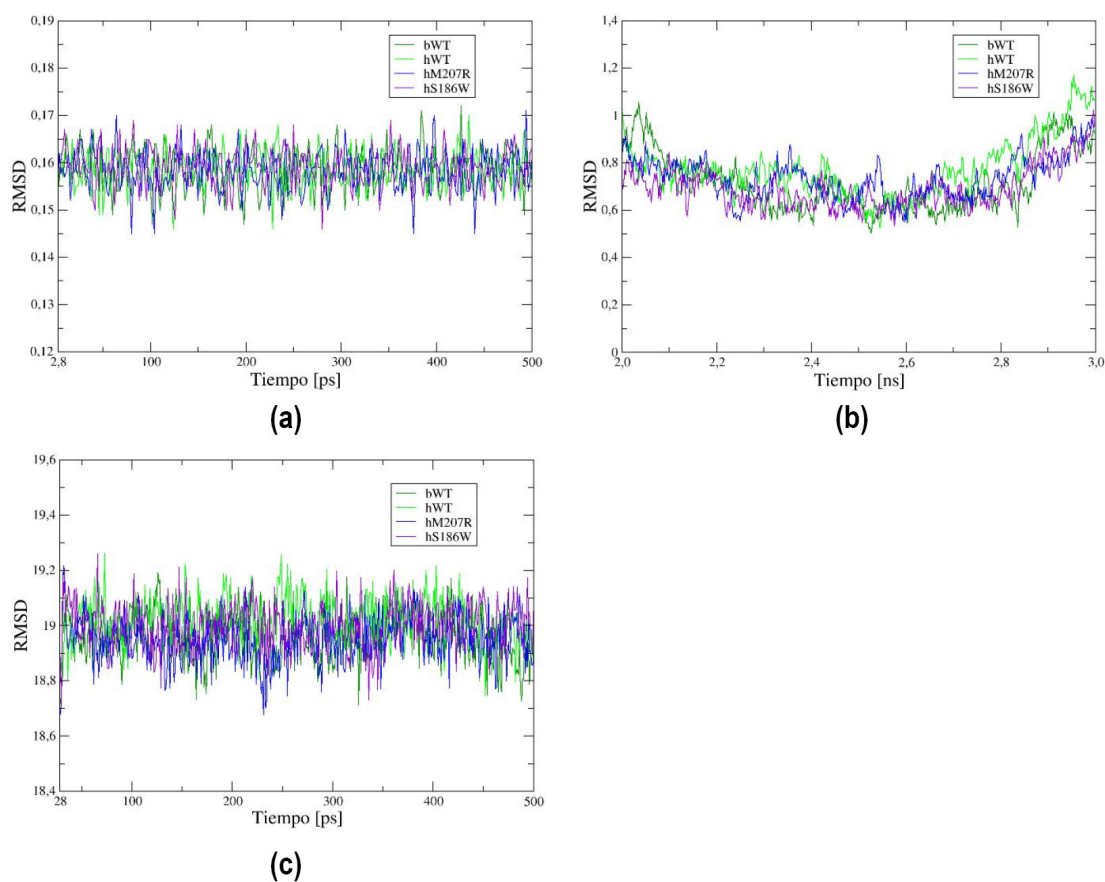


Figura A11. Evolución de RMSD durante las simulaciones de dinámica molecular (MD): (a, b) con la proteína en bicapa lipídica solvatada (a) restringida (MD_2^R), (b) no restringida (MD_2^L); y (c) con la proteína solvatada (MD_1). bWT (verde oscuro), hWT (verde claro), hM207R (azul), y hS186W (violeta).

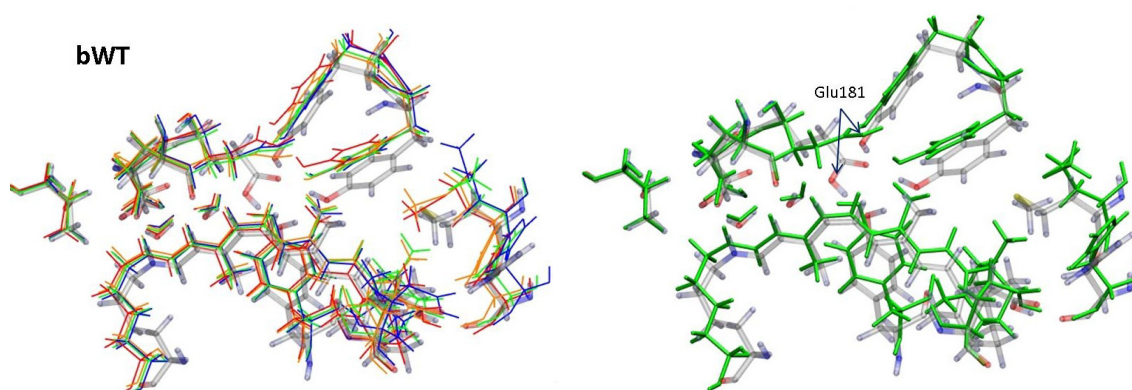


Figura A12. Superposición de sitios de unión del retinal de la rodopsina bWT a partir de estructuras QM/MM optimizadas de la simulación MD₂^L y una estructura QM/MM de MD₁. Código de colores: MD₁, transparente; MD₂^L, rojo: 250 ps, verde: 370 ps, naranja: 500 ps, azul: 1 ns. A la izquierda: superposición de todas las estructuras; a la derecha: estructura QM/MM del sistema bWT (MD₂^L) después de 370 ps vs geometría QM/MM del sistema bWT pero del modelo MD₁.

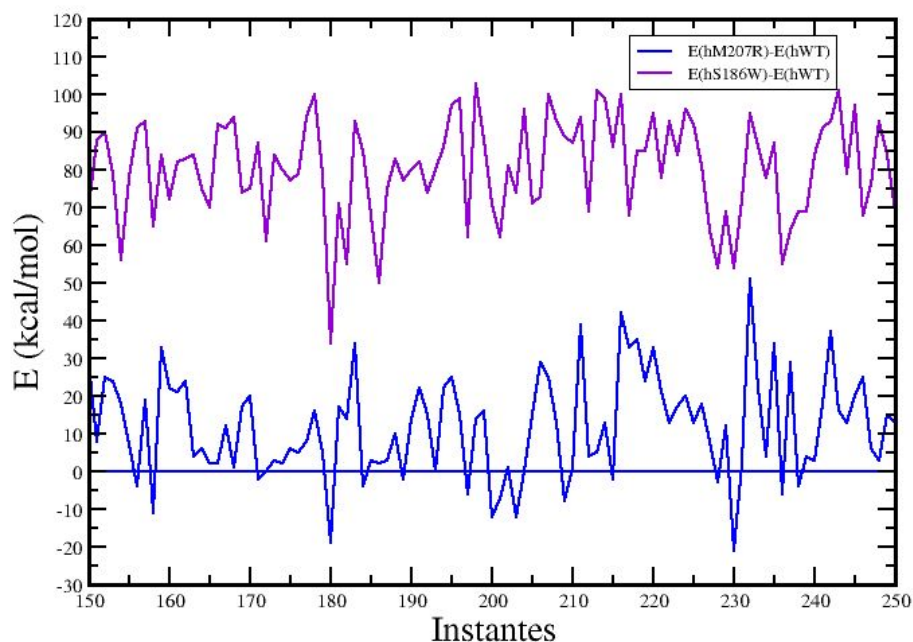


Figura A13. Diferencias de energías MM totales (E) entre cada mutante (hM207R o hS186W) y hWT para el núcleo proteínico (Glu113, Lys296, 11-*cis*-retinal, H₂O, Glu181, Tyr191, Tyr192, Tyr268 y Thr94; 182 átomos) de la rodopsinas insertadas en membrana. Las diferencias son calculadas a partir de los valores de energía de los últimos 101 instantes registrados durante la dinámica molecular clásica MD₂^R. E(hM207R)-E(hWT) en azul y E(hS186W)-E(hWT) en violeta.

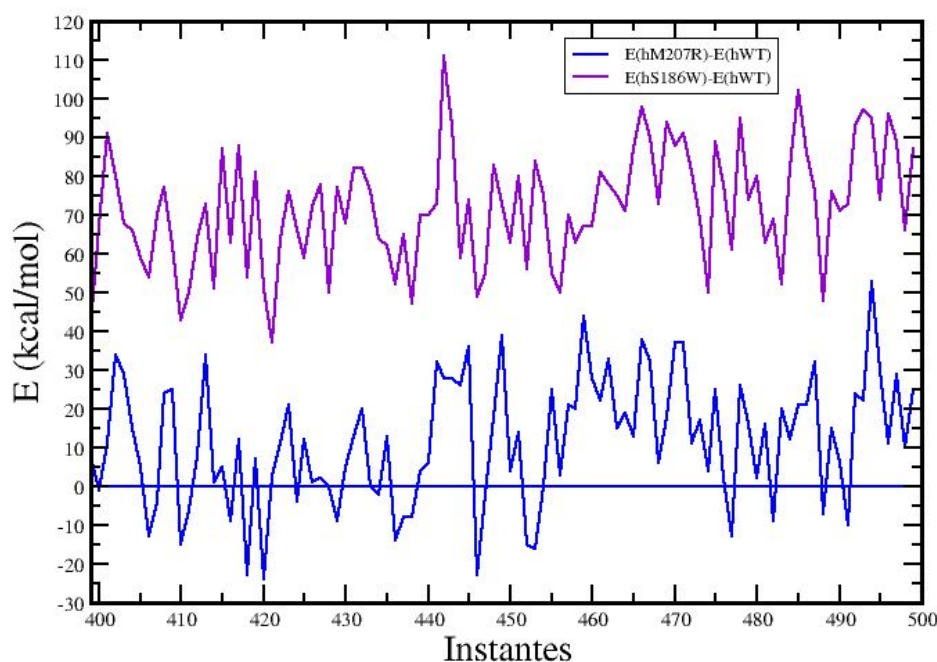


Figura A14. Diferencias de energías MM totales (E) entre cada mutante (hM207R o hS186W) y hWT para el núcleo proteínico (Glu113, Lys296, 11-*cis*-retinal, H₂O, Glu181, Tyr191, Tyr192, Tyr268 y Thr94; 182 átomos) de la rodopsinas insertadas en membrana. Las diferencias son calculadas a partir de los valores de energía de los últimos 101 instantes registrados durante la dinámica molecular clásica MD₂^L. E(hM207R)-E(hWT) en azul y E(hS186W)-E(hWT) en violeta.

Tabla A1. Energías MM promedios absolutas y relativas (kcal/mol) del núcleo proteínico (Glu113, Lys296, 11-*cis*-retinal, H₂O, Glu181, Tyr191, Tyr192, Tyr268 y Thr94; 182 átomos) de la rodopsinas insertadas en membrana. Las energías promedios son obtenidas a partir de los valores de los últimos 101 instantes registrados durante las simulaciones MD₂^R y MD₂^L (Figuras A13 y A14).

Estructura	MD ₂ ^R		MD ₂ ^L	
	Energía Total	Energía relativa	Energía Total	Energía relativa
hWT	166,9 ± 9,7 ^(a)	0	176,0 ± 11,9 ^(a)	0
hM207R	179,0 ± 10,2	12,1	187,9 ± 10,9	11,9
hS186W	247,8 ± 10,5	80,9	248,4 ± 11,4	72,4

^(a)Media aritmética ± desviación típica.