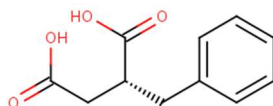


Neste tutorial vamos usar o software de visualização PyMOL para analisar várias estruturas da Carboxipeptidase A (CPA) e enzima conversora da angiotensina (ACE) no contexto do desenho de fármacos anti-hipertensivos da família do Captopril. Muitos dos comandos descritos neste tutorial são *comandos de consola*, os quais devem ser teclados na área janela de consola (ver o tutorial de introdução ao PyMOL).

1. Descarregue a estrutura cristalográfica da Carboxipeptidase A bovina (CPA), sem ligandos, com o código PDB 1M4L

- Represente a estrutura no modo “sticks” usando o comando “as sticks”
- Represente o ião Zinco ( $\text{Zn}^{2+}$ ) no centro activo como o comando “show spheres, element Zn”
- Faça “zoom” na zona do centro activo com o comando “zoom element Zn”. Use a roda do rato para aumentar a espessura do campo de visão, mostrando mais resíduos à volta do átomo de Zinco.
- Identifique os resíduos de aminoácido que participam na coordenação do ião  $\text{Zn}^{2+}$  (note que um dos ligandos coordenados é uma molécula de água, que aparece apenas como “O”, visto que os hidrogénios não são geralmente visíveis nos ficheiros PDB).
- Utilize o comando “show surface” para visualizar a cavidade do centro activo.
- Apague a superfície com “hide surface”, apague os sticks e linhas com “hide sticks” e “hide lines”. Deverá ficar apenas com a esfera do elemento Zn. Agora represente a arquitectura da proteína com o comando “show cartoon”.
- Represente apenas os resíduos na região do centro activo com “show sticks, all within 15.0 of element Zn”.
- Represente a laranja os resíduos apolares da proteína com “color orange, ala+val+leu+ile+phe+tyr+trp+met+cys/”. Consegue visualizar a região apolar da cavidade do centro activo da Carboxipeptidase A ?
- Execute novamente o comando “show surface”, para melhor visualizar a cavidade do centro activo. Torne a superfície transparente com “set transparency, 0.5”.

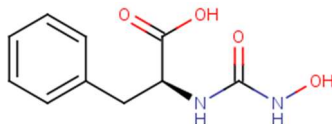
2. Descarregue a estrutura da CPA em complexo com o inibidor benzil-succinato (código PDB 1CBX).



- Repita os passos a-c do 1.
- Para visualizar melhor o inibidor ligado no centro activo, execute o comando “color hotpink, BZS/” (“BZS” é o código do ligando benzil-succinato no ficheiro PDB).
- Verifique o modo de coordenação do Zn e a interacção com o inibidor.
- Verifique quais os resíduos da proteína com que interage o BZS. Para tal, clique no inibidor, que ficará selecionado. Em seguida, no menu do objetos escolha “(sele)” e depois “find”, “polar contacts”, “to other atoms in object”. As interacções polares do inibidor com resíduos da proteína serão assinaladas. Use o comando “select all near\_to 5.0 of BZS/” para seleccionar átomos próximos do inibidor. Colorir os átomos

seleccionados a laranja e mostrar a superfície com “show surface”. Consegue ver quais os resíduos da cavidade que estão em contacto com o ligando

3. Descarregue a estrutura da CPA em complexo com o inibidor N-(hydroxycarbamoyl)-L-phenylalanine (código PDB 1HEE).

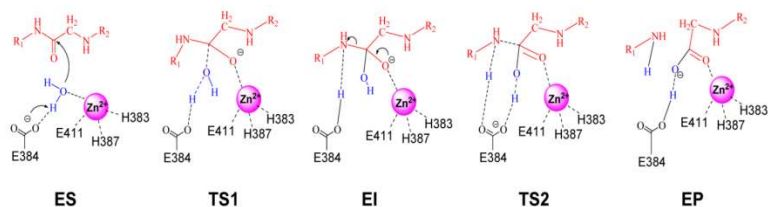


- Repita os passos a-c do número 1.
- Para visualizar melhor o inibidor ligado no centro activo, execute o comando “color hotpink, LHY/ (“BZS” é o código do ligando benzil-succinato no ficheiro PDB).
- Este inibidor tem um modo de ligação muito semelhante ao substrato, compare-o com o BZS no ficheiro PDB anterior (sugestão: carrega ambas as moléculas no PyMOL e sobreponha-as com o comando “align 1hee, 1cbx”)

4. Descarregue a estrutura da enzima conversora da angiotensina human (PDB 1UZF) em complexo com o inibidor Captopril.



- Identifique o ião  $\text{Zn}^{2+}$  no centro activo da ACE, representando-o como uma esfera.
- O Captopril tem código “MCO”, represente-o de uma cor diferente e observe o seu modo de ligação ao enzima, em particular na coordenação do ião  $\text{Zn}^{2+}$ .
- Considere a seguinte proposta de mecanismo catalítico da ACE:



Identifique os resíduos envolvidos. Represente-os na forma de “sticks”