

Neste tutorial vamos usar o software de visualização PyMOL para analisar várias estruturas da Carboxipeptidase A e enzima conversora da angiotensina (ACE) no contexto do desenho de fármacos anti-hipertensivos da família do Captopril.

Alguns comandos básicos do PyMOL :

- a) Rotação da molécula: arrastar e pressionar o botão esquerdo do rato.
- b) Translação da molécula: arrastar e pressionar o botão central do rato.
- c) “Zoom” (escalamento) da molécula: arrastar na vertical, pressionando o botão direito do rato.
- d) Espessura do campo de visão: mouse wheel
- e) Seleccionar átomo, resíduo, cadeia ou objecto: single- click com o botão esquerdo do rato
- f) Identificar átomo: single-click (botão direito do rato) ou double-click (botão esquerdo do rato)
- g) Marcar átomo (pick): double-click com o botão direito do rato
- h) Para executar outros tipos de comandos como “show surface” ,”hide spheres”, “as sticks”, etc... escrever o comando na janela secundária do Pymol (a janela mais pequena, que contem uma caixa para a linha de comando

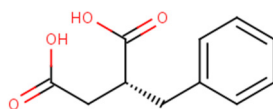
As moléculas a visualizar no PyMOL são obtidas no site do Protein Databank (<http://www.pdb.org>). Deverá descarregar as moléculas no formato “Pdb file (texto)”, sendo a extensão “.pdb” destes ficheiro automaticamente associada pelo Windows ao programa PyMOL (ou seja, fazendo double-click num destes ficheiros abrirá o PyMOL).

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

- a) Represente a estrutura no modo “sticks” usando o comando “as sticks”
- b) Represente o átomo de Zn no centro activo como o comando “show spheres, elemento Zn”
- c) 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 Zn.
- d) Identifique os resíduos de aminoácido que participam na coordenação do ião 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).
- e) Utilize o comando “show surface” para visualizar a cavidade do centro activo.
- f) 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”.
- g) Represente apenas os resíduos na região do centro activo com “show sticks, all within 18.0 of element Zn”.

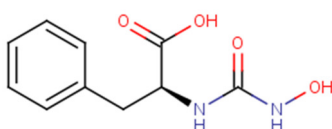
- h) Represente a laranja os resíduos apolares da proteína com “color orange, ala+val+leu+ile+phe+tyr+trp+met+cys/”. Consegue visualizar a região apolar da cavidade do centro activo da Carboxipeptidase A ?

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



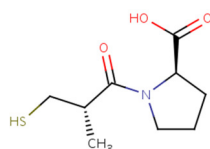
- Repita os passos a-c do 1.
- Para visualizar melhor o inibidor ligado no centro activo, execute o comando “color hotpink, BZS/ (“BZS” é o código do ligando benzil-succinato no ficheiro PDB).
- Verifique o modo de coordenação do Zn e a interacção com o inibidor.
- Verifique quais os resíduos da proteína com que interage o BZS.

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

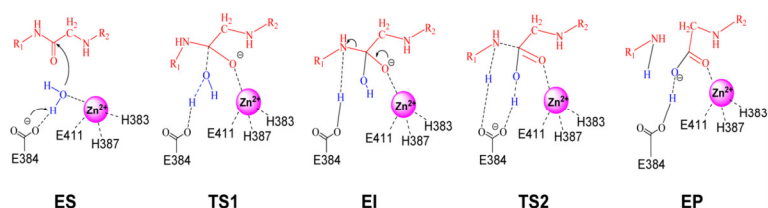


- Repita os passos a-c do número 1.
- Para visualizar melhor o inibidor ligado no centro activo, execute o comando “color hotpink, LHY/ (“BZS” é o código do ligando benzil-succinato no ficheiro PDB).
- Este inibidor tem um modo de ligação muito semelhante ao substrato, compare-o com o BZS no ficheiro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

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



- Identifique o ião 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 Zn^{2+} .
- Considere o mecanismo catalítico da ACE:



- Identifique os resíduos envolvidos.