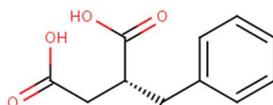


Neste tutorial vamos usar o software de visualização PyMOL para analisar várias estruturas da Carboxipeptidase A (CPA) e enzima conversora da angiotensina (ACE) no contexto do desenho de fármacos anti-hipertensivos da família do Captopril. Muitos dos comandos descritos neste tutorial são *comandos de 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 ( $Zn^{2+}$ ) 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  $Zn^{2+}$  (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 o novamente o comando “show surface”, para melhor visualizar a cavidade do centro activo. Torne a superfície transparente com “set transparency, 0.5”.

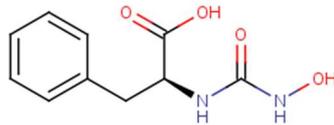
2. Descarregue a estrutura da CPA em complexo com o inibidor benzil-succinato (código PDB 1CBX).



- 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 seleccionado. 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

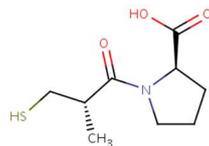
seleccionados a laranja e mostrar a superfície com “show surface”. Consegue ver quais os resíduos da cavidade que estão em contacto com o ligando

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

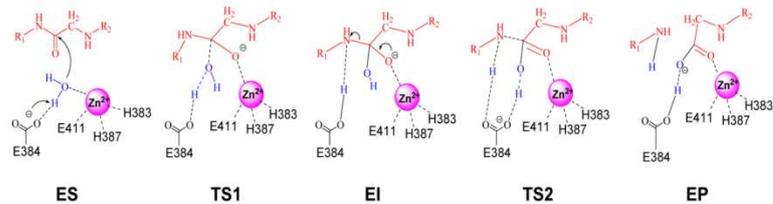


- Repita os passos a-c do número 1.
- Para visualizar melhor o inibidor ligado no centro activo, execute o comando “color hotpink, LHY/ (“BZS” é o código do ligando benzil-succinato no ficheiro PDB).
- Este inibidor tem um modo de ligação muito semelhante ao substrato, compare-o com o BZS no ficheiro 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  $Zn^{2+}$  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 a seguinte proposta de mecanismo catalítico da ACE:



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

5. A ACE somática (sACE) é uma forma humana da ACE que contém dois domínios extracelulares, denominados sACE-N (extremidade Nterminal), e sACE-C (extremidade Cterminal). Os domínios possuem estruturas semelhantes, com um centro activo capaz de catalisar a degradação da Anngiotensina-I e da Bradicininina. As diferenças na sequênciã dos dois domínios podem ser exploradas para conseguir o desenho de inibidores com maior especificidade quer para sACE-N ou sACE-C. Descarregue as estruturas da sACE-N em complexo com o Sampatrilat (pdb 6F9V) e da sACE-C em complexo como o Omapatrilat (pdb 6H5W).

a) Carregue as estruturas no PyMOL com o comando "load". Sobreponha as estruturas com "align 6F9V, 6H5W". Represente as estruturas como "ribbon" e os átomos de zinco como esferas. Colorir 6F9V de verde e 6H5W de vermelho.

b) Para visualizar os ligandos, faça "show sticks, organic" (o descritor de seleção "organic" seleciona automaticamente pequenas moléculas orgânicas presentes no ficheiro PDB, tais como ligandos de macromoléculas). De seguida, click nos ligandos com botão direito do rato para identificar os seus nomes, e mude as cores dos mesmos ligandos para amarelo e laranja.

c) Use o comando "show sticks, within 0.5 of element ZN" para visualizar como "sticks" os resíduos próximos do centro activo.

d) Use o comando "show surface" para visualizar a superfície molecular da proteína e identificar a cavidade do centro activo da sACE N e C. Observe e compare a orientação dos ligandos na cavidade correspondente do centro activo.