

INTRODUCCIÓ

L'objectiu del present document es mostrar com convertir la imatge cristal·logràfica d'una proteïna en un objecte físic mitjançant l'ús d'una impressora 3D.

Els software utilitzat es *freeware* per a us educatiu, tan sols requereix del registre per a descarregar-lo.

Keywords: *proteïna, impressió 3D, enzim-ligand, fàrmac*

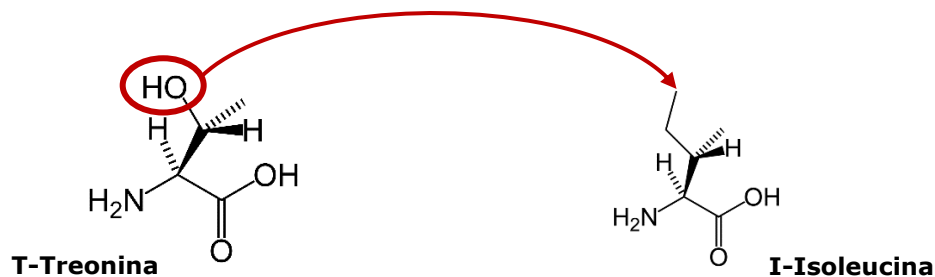
ABL1

L'ABL1 es una proteïna que té un paper molt rellevant en el càncer. Mes concretament, la translocació cromosòmica en la proteïna de fusió BCR-ABL té una relació directa amb la leucèmia crònica (LMC).

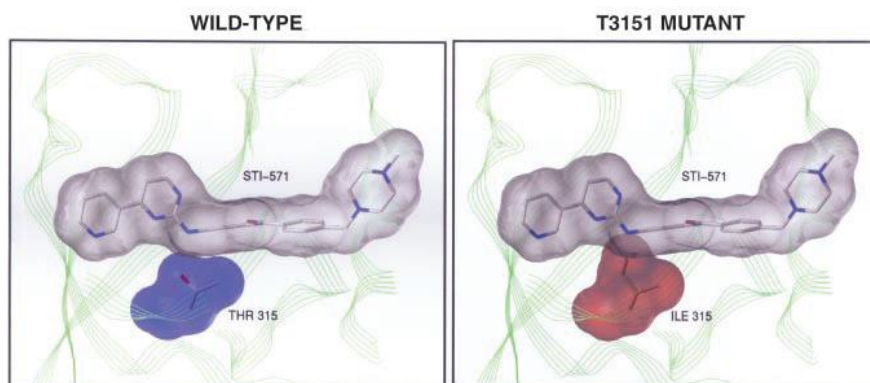
El gen ABL1 es un protooncogen que codifica una proteïna tirosina-cinasa implicada en una gran varietat de processos cel·lulars. L'activitat de la proteïna està negativament regulada pel seu domini SH3. La alteració d'aquesta regió, resulta en una activació permanent de la tirosina-cinasa. Aquest fet comporta una desregulació del cicle cel·lular, donant lloc a una proliferació cel·lular.

L'imatinib es un fàrmac desenvolupat mitjançant el disseny racional de fàrmacs. D'aquesta manera, l'imatinib va ser dissenyat per a actuar de forma molt similar a l'ATP, però actuant com a inhibidor del domini tirosina-cinasa.

La mutació de l'anomenat "residu guardià" (en anglès, *gatekeeper residue*) de la quinasa confereix resistència al fàrmac. La mutació més típica es la variant T315I, on es produeix una substitució d'una treonina per una isoleucina. Aquest causa que la isoleucina alteri l'interior de la butxaca hidrofòbica.



No obstant això, mutacions addicionals en el gen ABL1 poden conferir altres tipus de resistència. En aquests casos, cal emprar els inhibidors de la tirosina quinasa de segona generació, com les dasatinib o el nilotinib.



SOFTWARE

PyMol <https://pymol.org/2/>

PyMOL és un sistema de visualització molecular open-source, mantingut i distribuït per una entitat privada, que ofereix llicència gratuïta per a usos educatius. Permet executar scripts.

Practical Pymol for Beginners https://pymolwiki.org/index.php/Practical_Pymol_for_Beginners

Guia bàsica d'utilització de PyMol.

NetFabb <https://www.autodesk.com/education/free-software/netfabb>

Software per modificar el model generat per PyMol. Existeix llicència gratuïta per al sector educatiu.

PROTOCOL

DESCARREGAR PROTEÏNES

El *Protein Data Bank* (PDB), és un dipòsit d'estructures 3-D de proteïnes i àcids nucleics. Aquesta informació, obtinguda mitjançant cristal·lografia de raigs X o ressonància magnètica nuclear. Biòlegs, químics i bioquímics d'arreu del món publiquen aquestes dades, sent domini públic.

Per a aquest exemple utilitzarem les estructures 2HYY i 2Z60, que representen la proteïna Abl cinasa salvatge i la seva versió mutada T315I, respectivament.

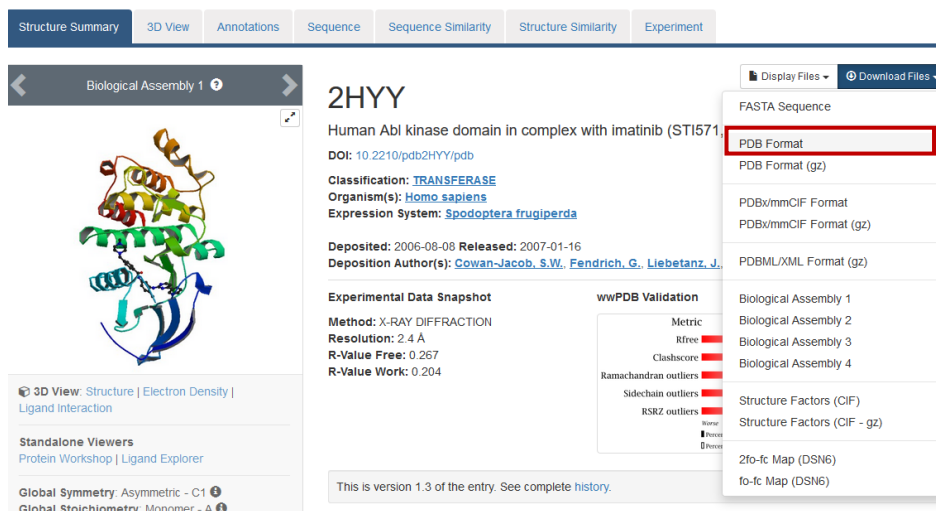
1. Accedir a la pagina principal de PDB (<https://www.rcsb.org/>).
2. Introduir el nom de la proteïna o el PDB Id dins el camp de cerca. En aquest cas, **2HYY** correspon al domini quinasa de la proteïna ABL1.

Es possible cercar la proteïna en altres espècies i comparar-les. En aquest cas, l'hemoglobina podria ser un bon exemple de biologia evolutiva (Nota: la hemoglobina consta de 2 cadenes σ i 2 cadenes β).



The screenshot shows the PDB website search results for 'Hemoglobin'. The search bar at the top contains 'Hemoglobin'. Below the search bar, there are tabs for '710 Structures', '17 Unreleased Structures', '262 Citations', '143 Ligands', and '33 News & PDB-101 Articles'. The search results are displayed in a table with columns for 'View', 'Reports', and 'Sort'. The first result is '1FN3' (CRYSTAL STRUCTURE OF NICKEL RECONSTITUTED HEMOGLOBIN-A CASE FOR PERMANENT, T-STATE HEMOGLOBIN) by Venkatesh Rao, S., Deepthi, S., Pattabhi, V., Manoharan, P.T. The structure is shown as a ribbon diagram. The 'Macromolecule' section lists 'HEMOGLOBIN ALPHA CHAIN (protein)' and 'HEMOGLOBIN BETA CHAIN (protein)'. The 'Unique Ligands' section lists 'HIS'. The 'Search term match score' is 268.56.

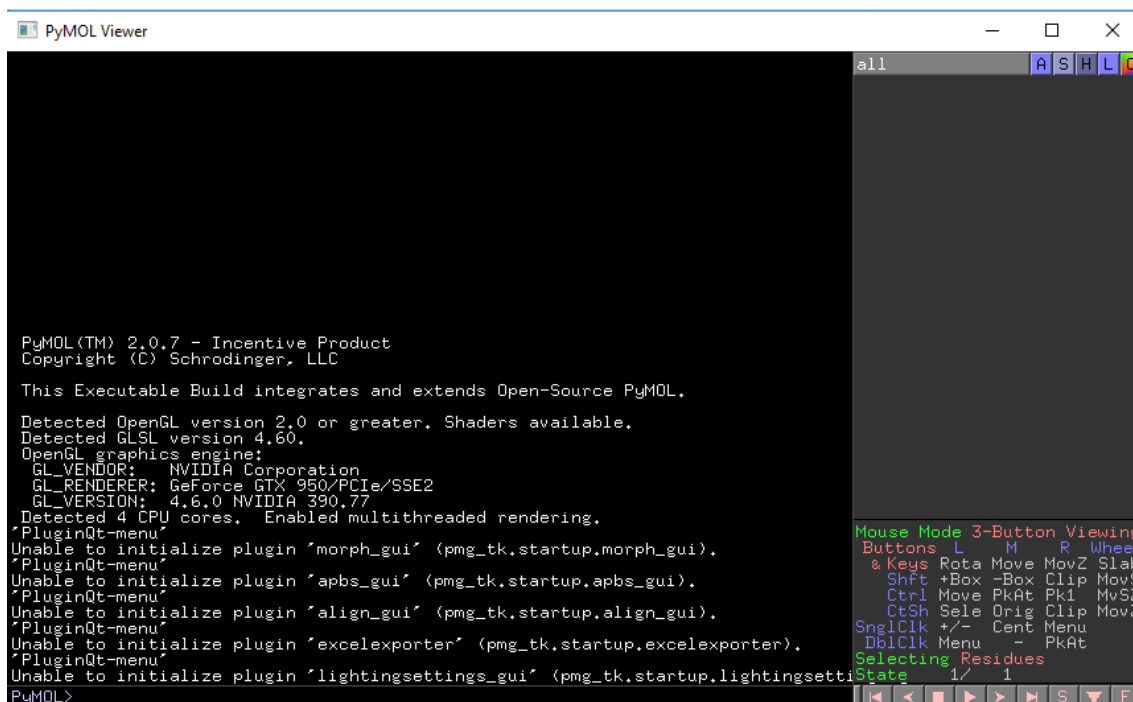
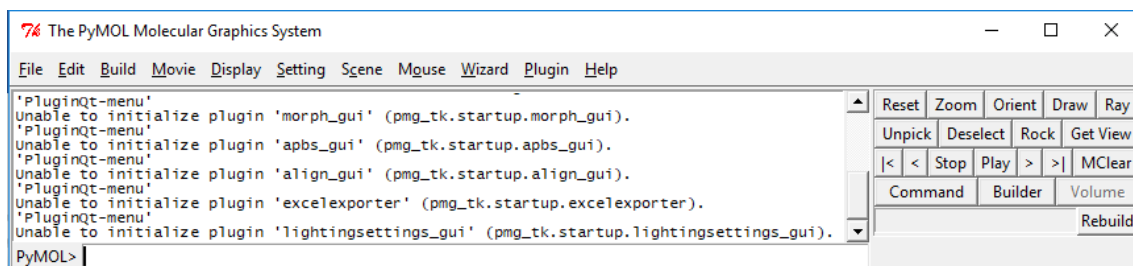
3. Descarregar en format PDB.



The screenshot shows the PDB website entry for 2HYY (Human Abl kinase domain in complex with imatinib (STI571)). The entry details include: DOI: 10.2210/pdb2HYY/pdb, Classification: TRANSFERASE, Organism(s): Homo sapiens, Expression System: Spodoptera frugiperda, Deposited: 2006-08-08, Released: 2007-01-16, Deposition Author(s): Cowan-Jacob, S.W., Fendrich, G., Liebetanz, J., Experimental Data Snapshot: Method: X-RAY DIFFRACTION, Resolution: 2.4 Å, R-Value Free: 0.267, R-Value Work: 0.204. The 'Download Files' menu is open, showing options: FASTA Sequence, PDB Format (highlighted with a red box), PDB Format (gz), PDBx/mmCIF Format, PDBx/mmCIF Format (gz), PDBML/XML Format (gz), Biological Assembly 1, Biological Assembly 2, Biological Assembly 3, Biological Assembly 4, Structure Factors (CIF), Structure Factors (CIF - gz), 2fo-fc Map (DSN6), and fo-fc Map (DSN6).

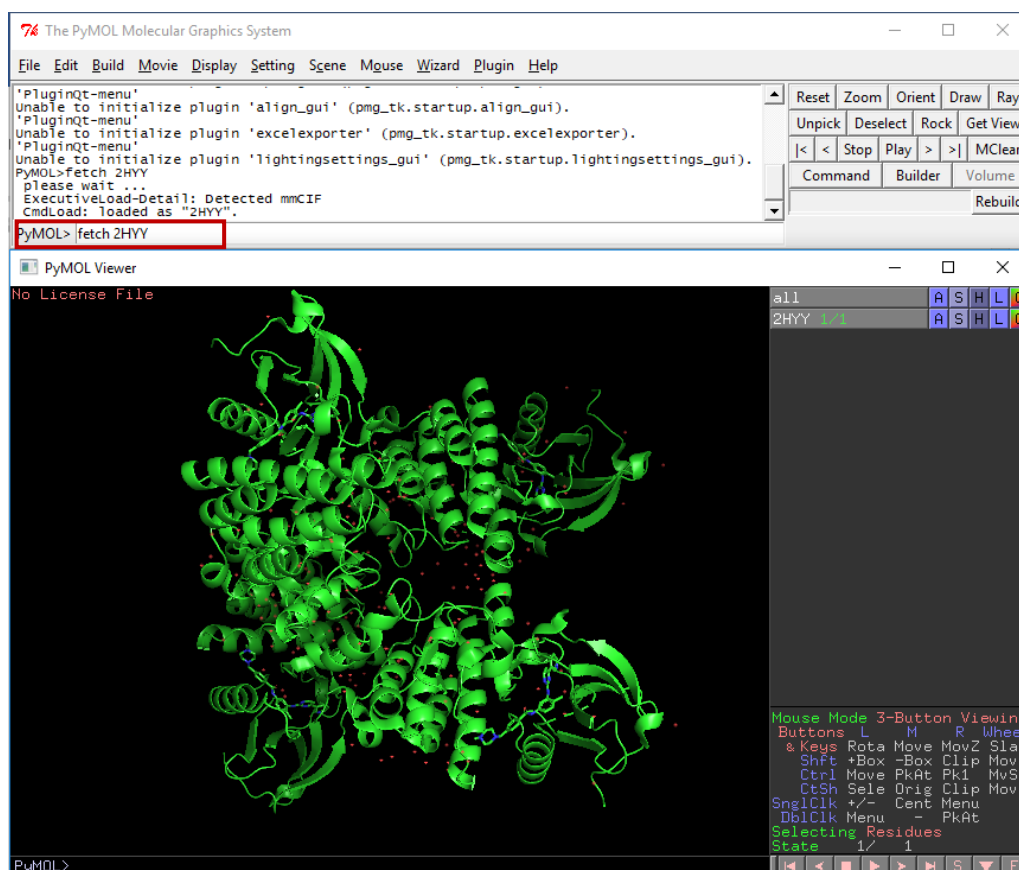
PROCESSAMENT PDB AMB PyMOL

1. Executar el programa PyMol¹. A la zona inferior, es troba la línia de comandes.



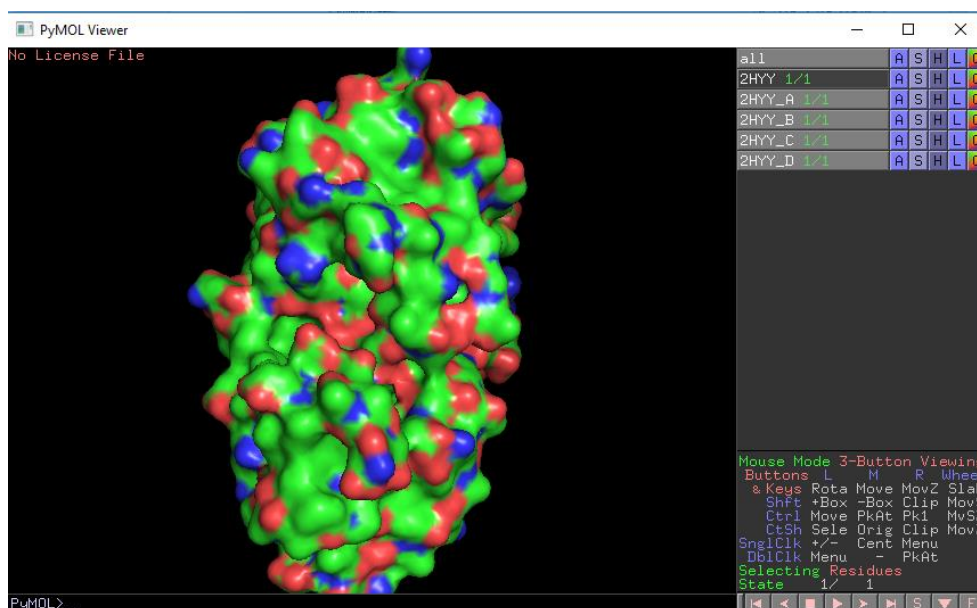
¹ Windows, Menu Inici: PyMol + Tcl-Tk Gui (Legacy)

2. Executar "fetch 2HYY" a la línia de comandes



La proteïna consta de 4 subunitats. En aquest exemple, es procedirà a produir un fitxer STL per a una de les subunitats, donat que processar tota la estructura requereix d'una gran potència de càlcul.

3. Executar la següent comanda "split_chains 2HYY; remove solvent; delete 2HYY 2HYY_B 2HYY_C 2HYY_D; hide licorice; show surface, 2HYY_A; save 2HYY_A.wrl;" (copiar sense "").

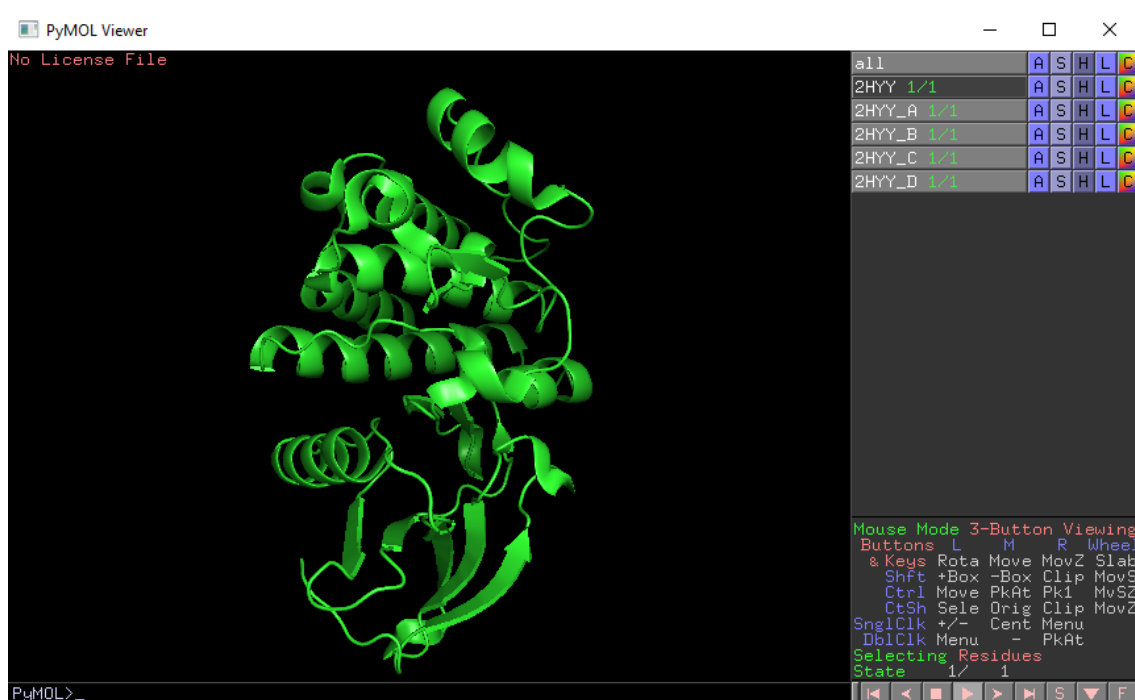


4. Dins de la carpeta "C:\Users\Public\Documents", s'haurà creat el fitxer 2HYY_A.wrl.

PyMol Script

```
### PyMol 3Dprint Surface Export ###
fetch 2HYY #carregar la proteïna des de PDB
split_chains 2HYY #dividir l'estructura en 4 cadenes
remove solvent #eliminar l'aigua
delete 2HYY 2HYY_B 2HYY_C 2HYY_D #eliminar cadenes
hide licorice #amagar el lligand
show surface, 2HYY_A #mostrar la superfície de la molècula
hide cartoon , 2HYY_A #amagar visualització alfa hèlix i lamines beta
set solvent_radius, 2.0 # modificar el radi del solvent, 1.4 Å per defecte
save 2HYY_A.wrl #salvar com a fitxer wrl
```

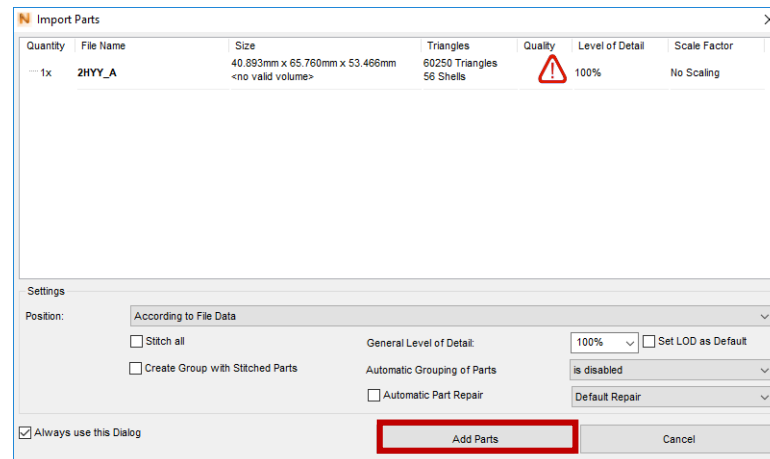
Es possible exportar la proteïna per tal de visualitzar diferents dominis, com les hèlix α o les lamines β . Si es desitja, es poden modificar els paràmetres d'aquests dominis abans d'exportar-lo.



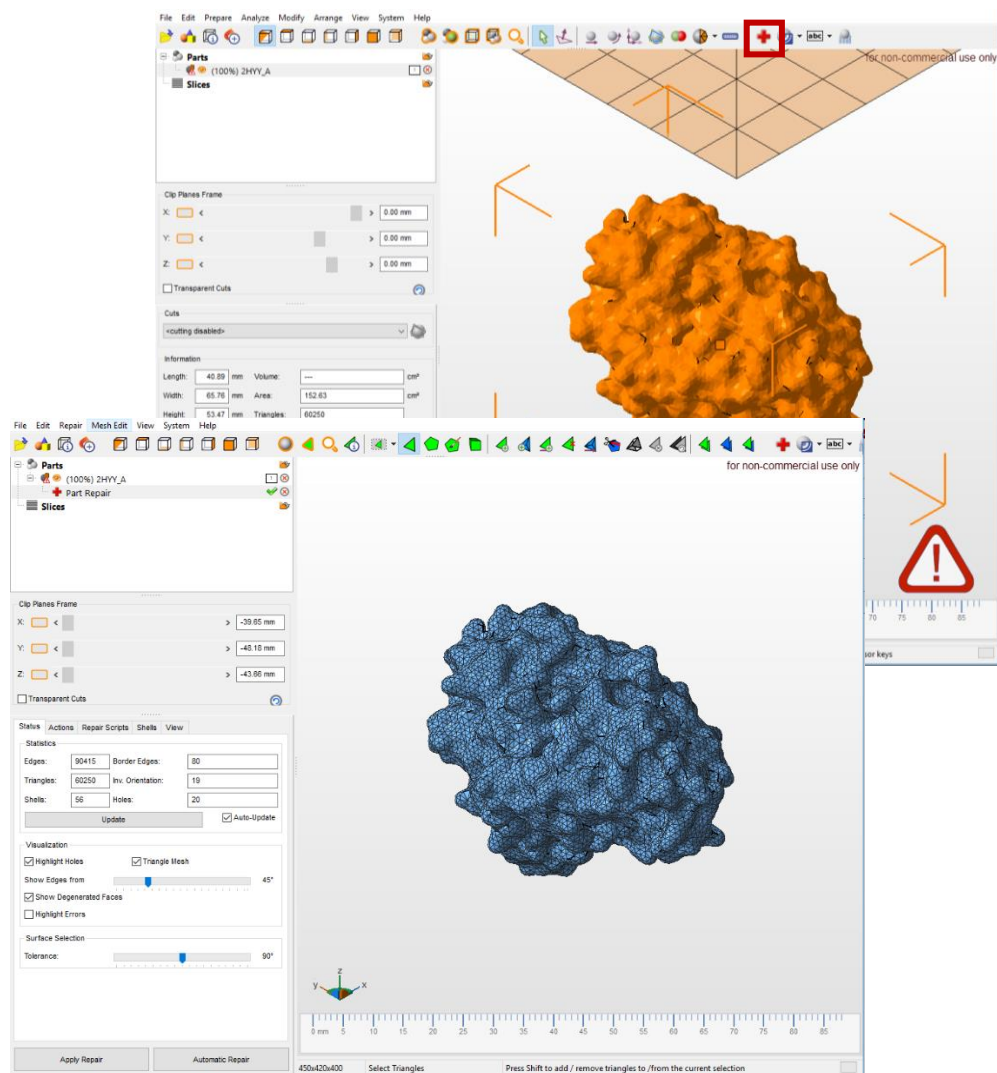
POST-PROCESSAMENT

En aquest apartat es procedirà a la reparació de la malla del model tridimensional

1. Executar Netfabb.
2. Obrir el fitxer 2HYY_A.wrl, la qual cosa donarà lloc a un error. Clicar a **Add Parts**.

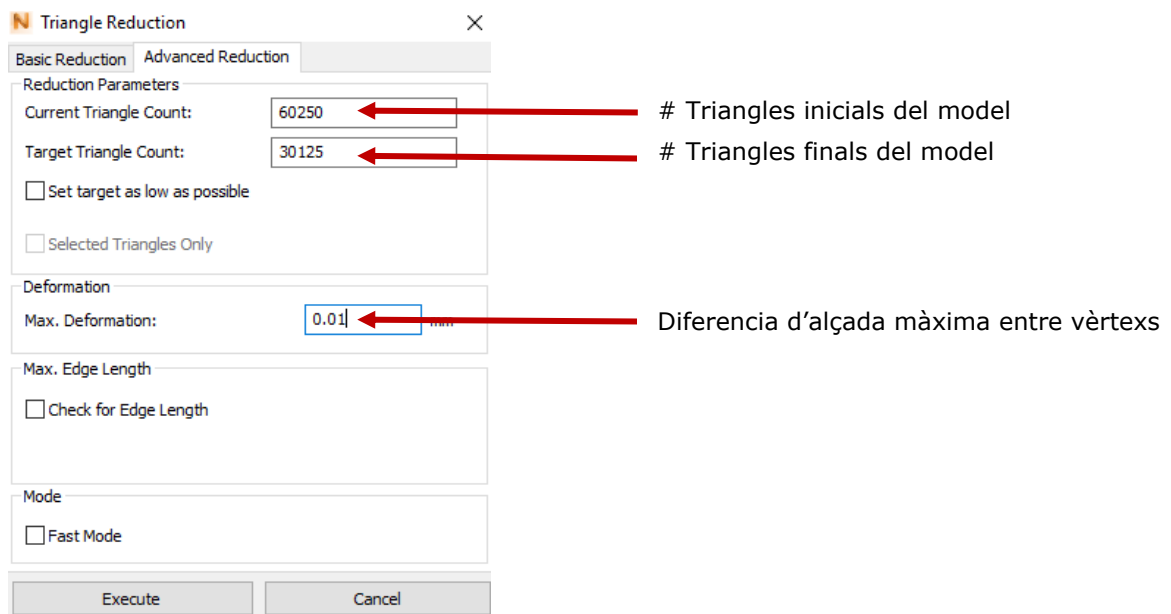
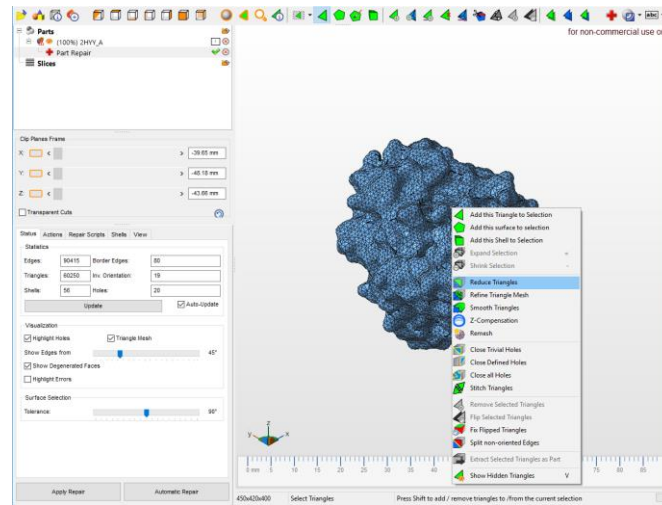


3. Executar **Repair**.

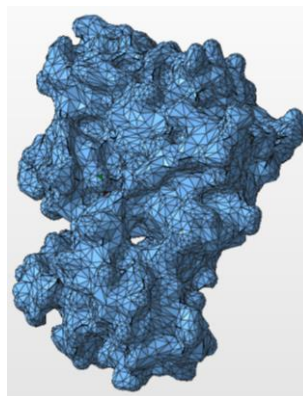


4. Clicar amb el boto secundari i escollir **Reduce Triangles**.

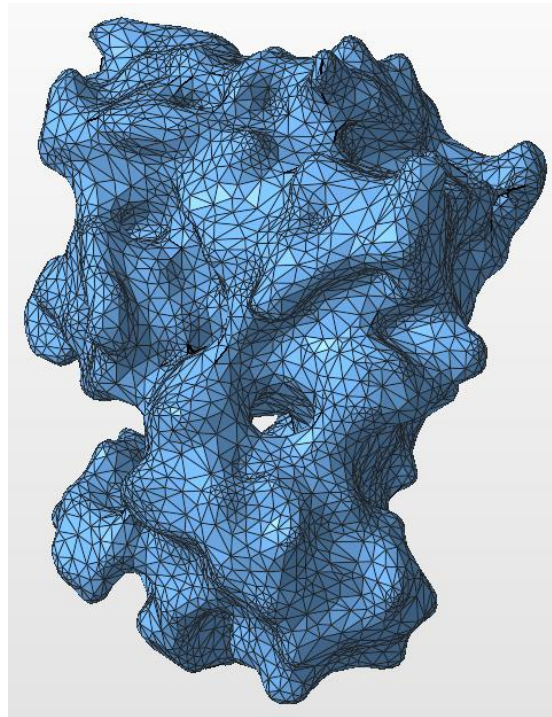
L'objectiu es reduir el nombre de triangles que componen el model tridimensional. Això facilitarà la seva impressió. Aquest pas permet modificar l'aparença de la proteïna. Es recomana jugar amb els diferents paràmetres. Amb l'ajut de Control+Z es poden desfer els canvis proposats.



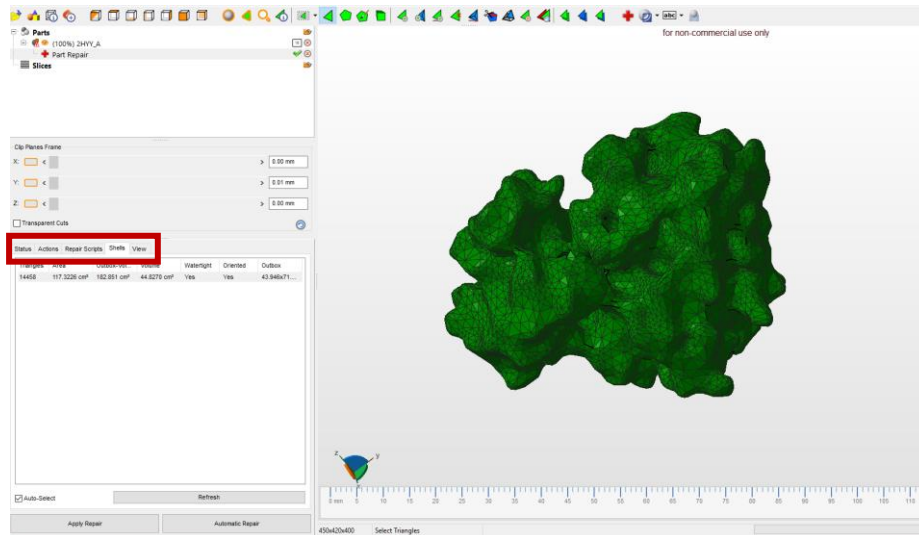
Una proposta es utilitzar **Target triangle Count** 20,000 i **Max. Deformation**: 1.0 mm



5. Es possible suavitzar els polígons per mitja de **Smooth Triangles**. En l'exemple s'ha utilitzat un valor **Strenght 1.4 Iterations**

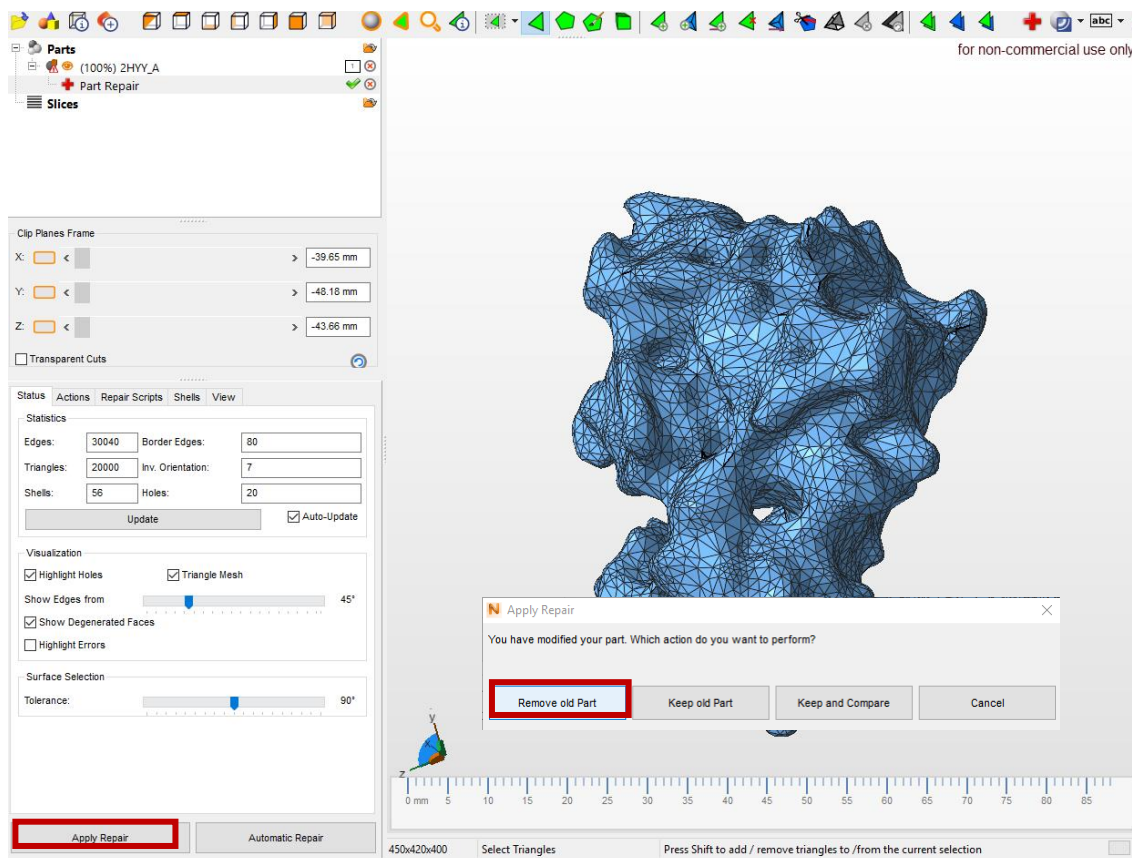


6. Comprovar que el model existeix com a un cos sòlid. La pestanya **Shells** només ha de mostrar un objecte.

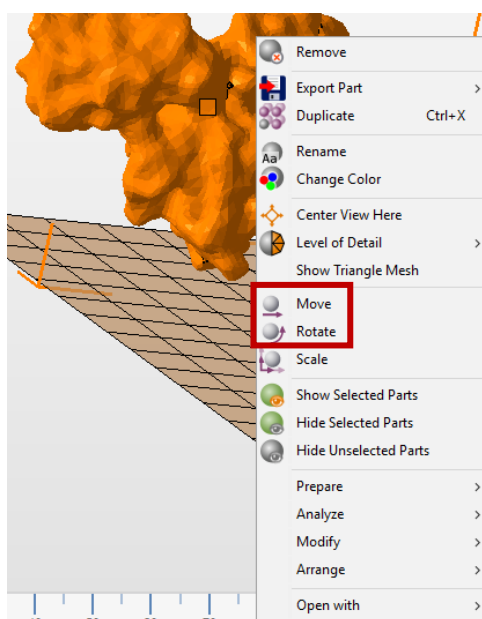


Status	Actions	Repair Scripts	Shells	View		
Triangles	Area	Outbox-Vol...	Volume	Watertight	Oriented	Outbox
14458	117.3226 cm²	182.851 cm³	44.8270 cm³	Yes	Yes	43.946x71....

7. Un cop assolida la forma desitjada, cal acceptar els canvis (**Apply Repair**). El programa preguntarà si volem substituir el model importat addicionalment (**Remove old Part**).

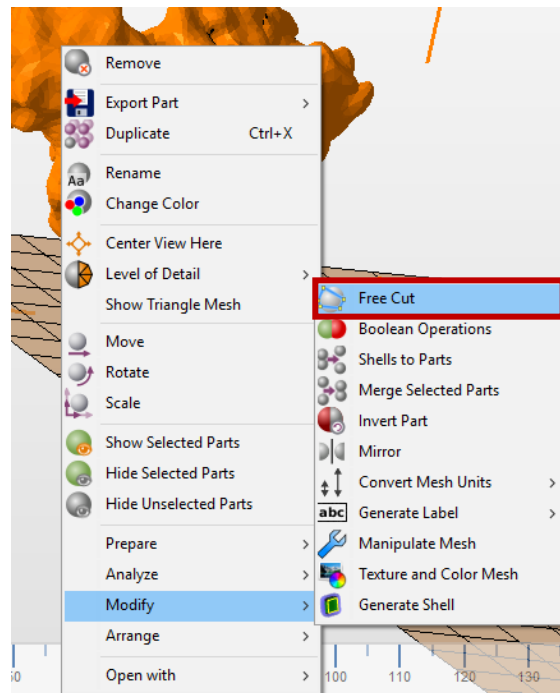


8. Mitjançant les comandes de **Move** i **Rotate** podem col·locar el model en la posició que interressi.

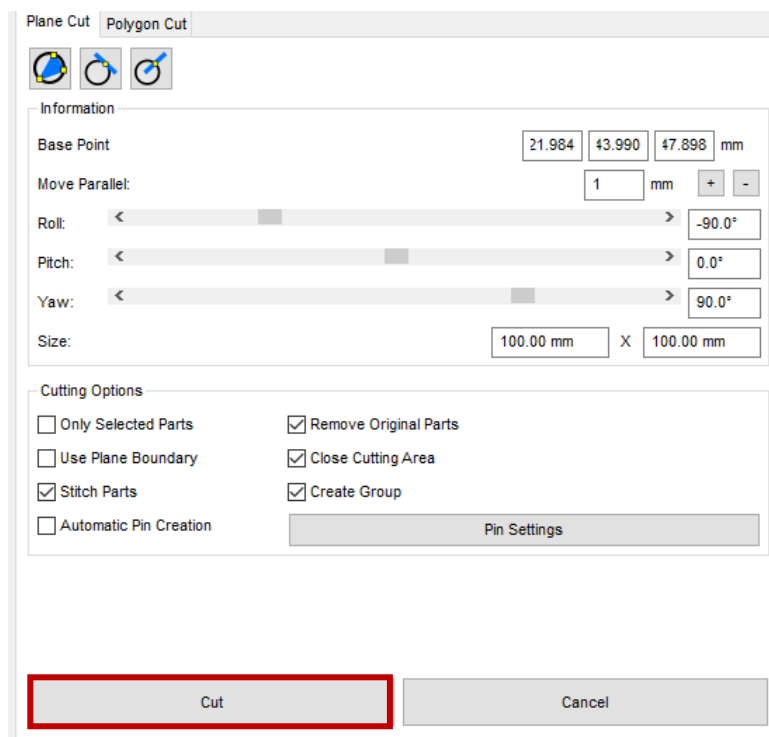


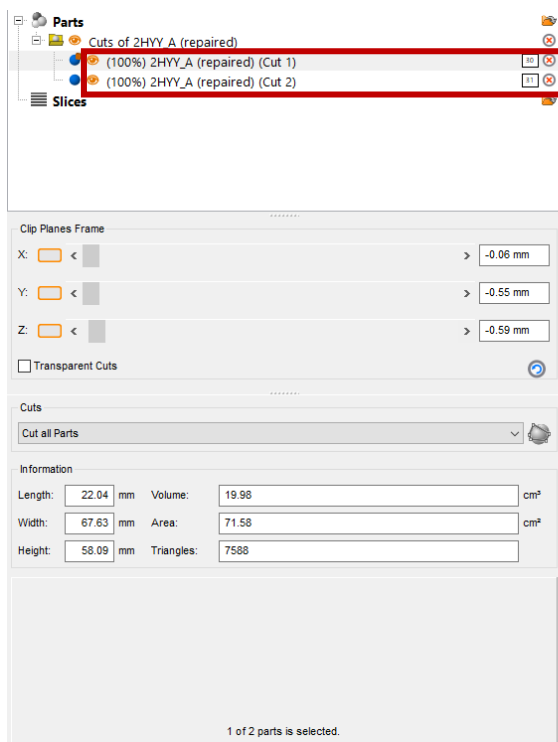
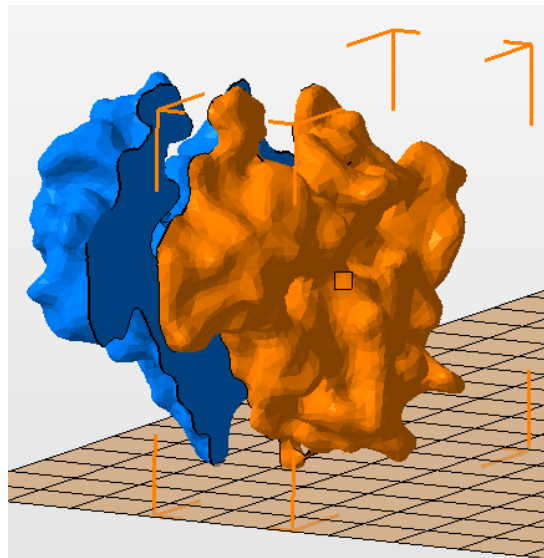
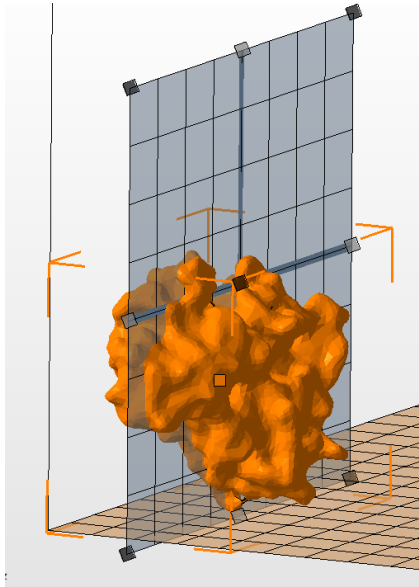
L'objecte ja pot ser exportat en STL per ser imprès. Es recomana utilitzar *rafts* i suports. Tot i així, si es desitja tenir un model on poder introduir el lligand, cal dividir el model tridimensional

9. Amb el boto secundari, clicar sobre el model i seleccionar **Modify -> Free Cut**

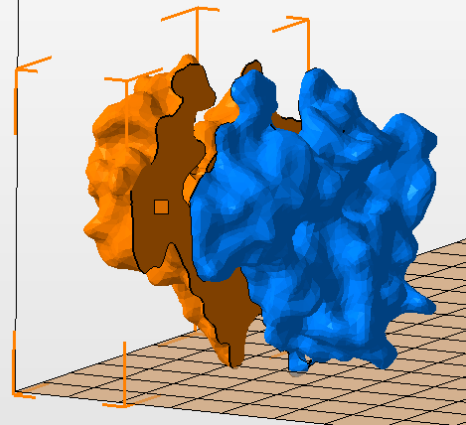


10. A la pestanya **Plane Cut** es troben les opcions per generar un pla de tall. En aquest cas, la referència es la butxaca hidrofòbica.





Model dividit en 2 parts



11. En cas de voler afegir ancoratges, cal marcar la opció **Automatic Pin Creation** i indicar les característiques del pin dins de **Pin Settings**.

Plane Cut Polygon Cut

Information

Base Point: 21.984 43.990 47.898 mm

Move Parallel: 1 mm + -

Roll: -90.0°

Pitch: 0.0°

Yaw: 90.0°

Size: 100.00 mm X 100.00 mm

Cutting Options

☐ Only Selected Parts ☒ Remove Original Parts

☐ Use Plane Boundary ☒ Close Cutting Area

☒ Stitch Parts ☒ Create Group

☐ Automatic Pin Creation Pin Settings

Cut Cancel

Pin Settings

Pin Type: Cylinder

General Settings

Height: 2.000 mm Min. Border Distance: 2.000 mm

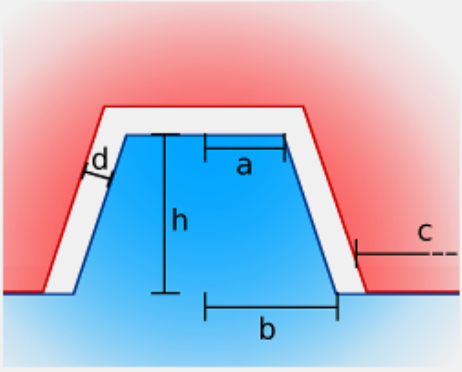
Distance of Pins (c): 5.000 mm Clearance (d): 0.200 mm

Cylinder Settings

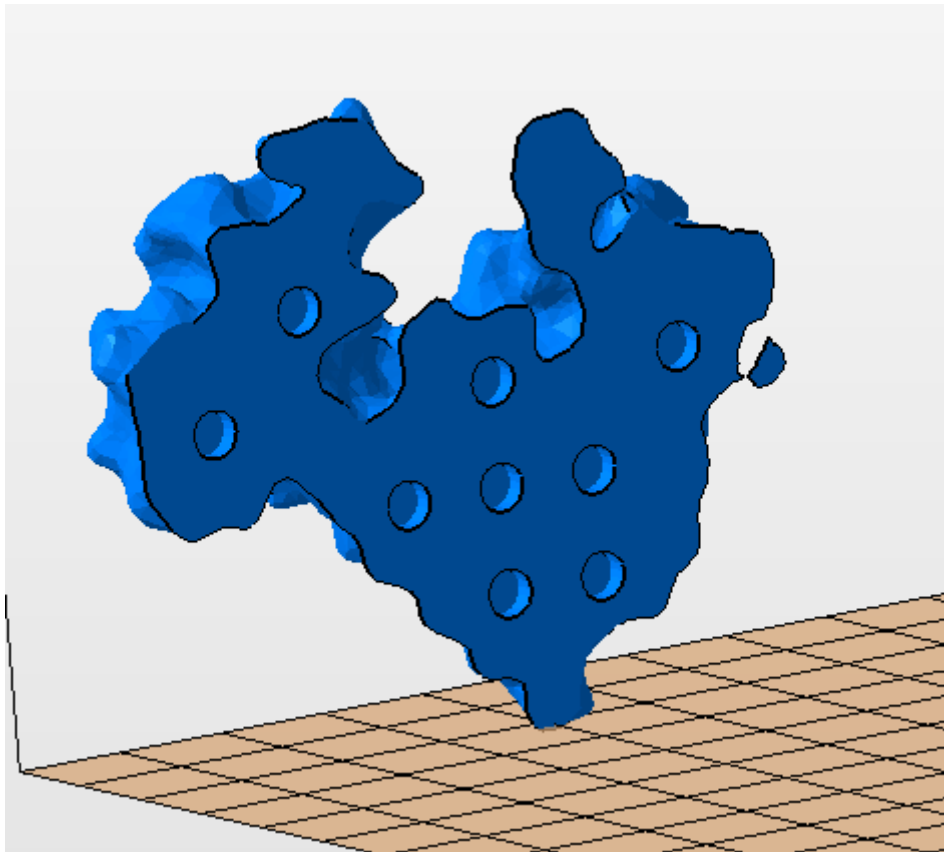
☒ Both Side Holes

Top Radius (a): 2.000 mm

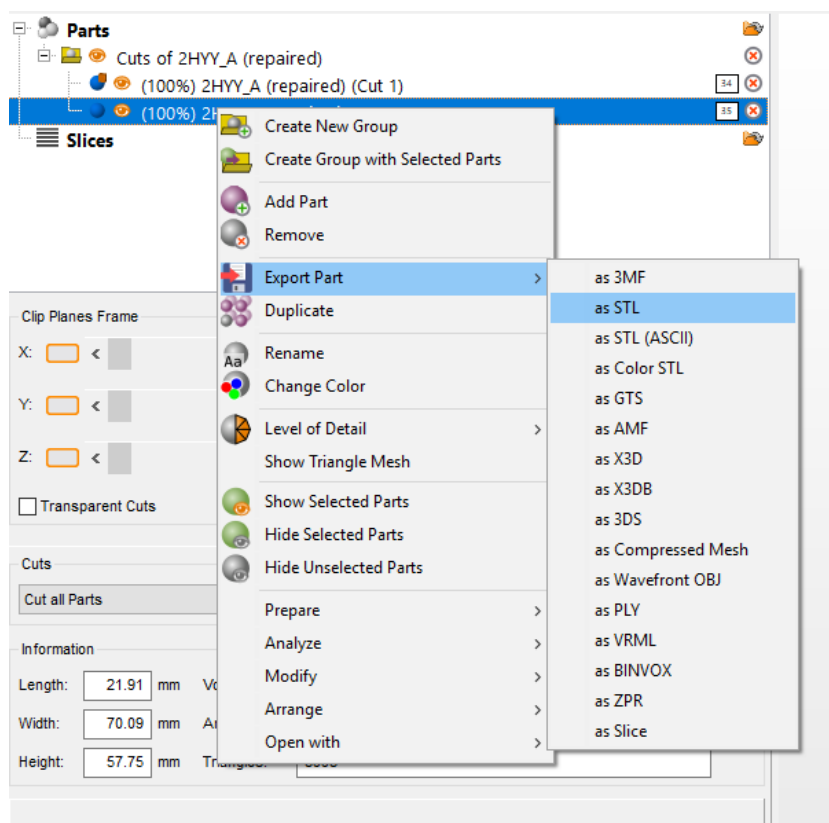
Bottom Radius (b): 2.000 mm



Apply Cancel



12. Exportar cada meitat com a STL.



13. Exportar com a STL i imprimir.



REFERENCIAS

Bioinformatics and variability in drug response: a protein structural perspective. Lathi JL et al. JRSOC Interface, 2017.

Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. Gorre ME et al. Science, 2001.

Structural biology contributions to the discovery of drugs to treat chronic myelogenous leukaemia. Cowan-Jacob SW et al. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2007.

Eduardo's Guide for 3D Printing Proteins. 2016.

3D Print Your Favorite Protein. Polka, J. ASCB, 2013.

Gleevec-resistant form of kinase BCR-ABL. HHMI, 2014.