

## INTRODUCCIÓN

El objetivo del presente documento es mostrar cómo convertir un fichero que contiene la imagen cristalográfica de una proteína en un objeto físico mediante el uso de una impresora 3D.

El software utilizado es freeware para uso educativo, tan sólo requiere del registro para descargarlo.

**Keywords:** *proteína, impresión 3D, enzima-ligando, fármaco*

## ABL1

El ABL1 es una proteína que tiene un papel muy relevante en el cáncer. Más concretamente, la translocación cromosómica en la proteína de fusión BCR-ABL tiene una relación directa con la leucemia crónica (LMC).

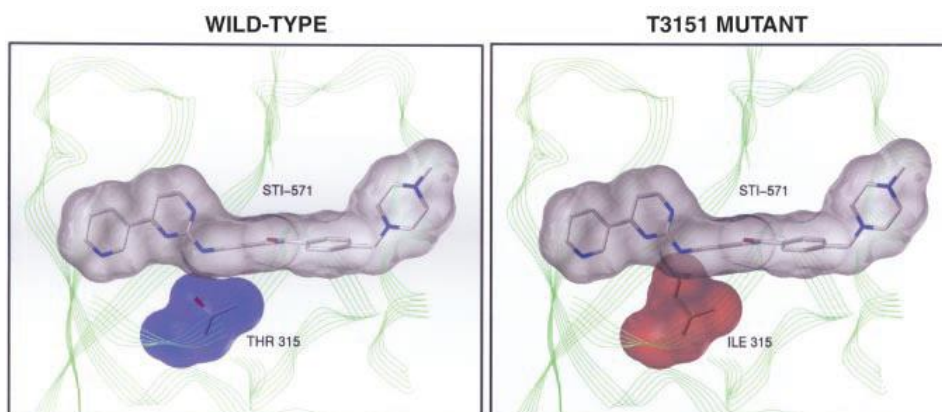
El gen ABL1 es un protooncogen que codifica una proteína tirosina quinasa implicada en una gran variedad de procesos celulares. La actividad de la proteína está negativamente regulada por su dominio SH3. La alteración de esta región resulta en una activación permanente de la tirosina quinasa. Este hecho comporta en una desregulación del ciclo celular, dando lugar a una proliferación celular.

El imatinib es un fármaco desarrollado mediante el diseño racional de fármacos. De este modo, el imatinib fue diseñado para actuar de forma muy similar a la ATP, pero actuando como inhibidor del dominio tirosina quinasa.

La mutación del llamado "residuo guardián" (en inglés, *gatekeeper residue*) de la quinasa confiere resistencia al fármaco. La mutación más típica es la variante T315I, donde se produce una sustitución de una treonina por una isoleucina. Este hecho causa que la isoleucina altere el interior del bolsillo hidrofóbico, evitando que el imatinib pueda alojarse en él.



Sin embargo, mutaciones adicionales en el gen ABL1 pueden conferir otros tipos resistencia. En estos casos, hay que recurrir los inhibidores de la tirosina quinasa de segunda generación, como las dasatinib o el nilotinib.



## SOFTWARE

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

PyMOL es una aplicación para la visualización molecular *open-source*, mantenido y distribuido por una entidad privada, que ofrece licencia gratuita para usos educativos. Permite ejecutar scripts.

**Practical Pymol for Beginners** [https://pymolwiki.org/index.php/Practical\\_Pymol\\_for\\_Beginners](https://pymolwiki.org/index.php/Practical_Pymol_for_Beginners)

Guía básica de utilización de PyMol.

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

Software para modificar el modelo generado por PyMol. Existe licencia gratuita para el sector educativo.

# PROTOCOLO

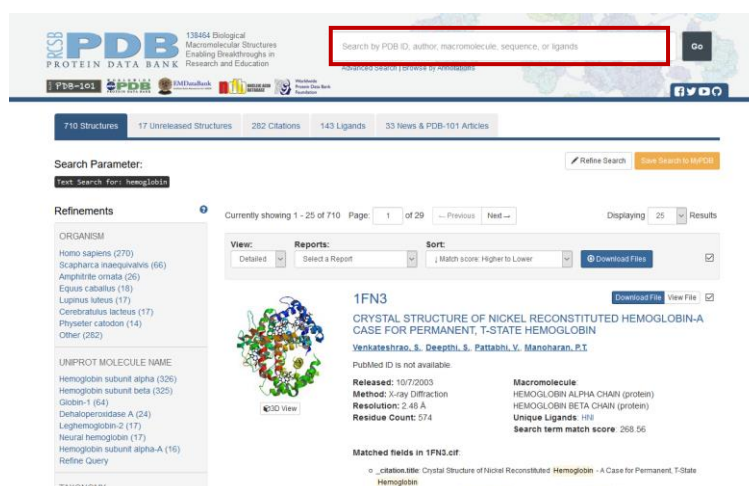
## DESCARGAR PROTEÍNAS

El *Protein Data Bank* (PDB), es un depósito de estructuras tridimensionales de proteínas y ácidos nucleicos. Esta información, obtenida mediante cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear. Biólogos, químicos y bioquímicos de todo el mundo publican estos datos, siendo de dominio público.

Para este ejemplo utilizaremos las estructuras 2HYY y 2Z60, que representan la proteína Abl cinasa *wild-type* y su versión mutada T315I, respectivamente.

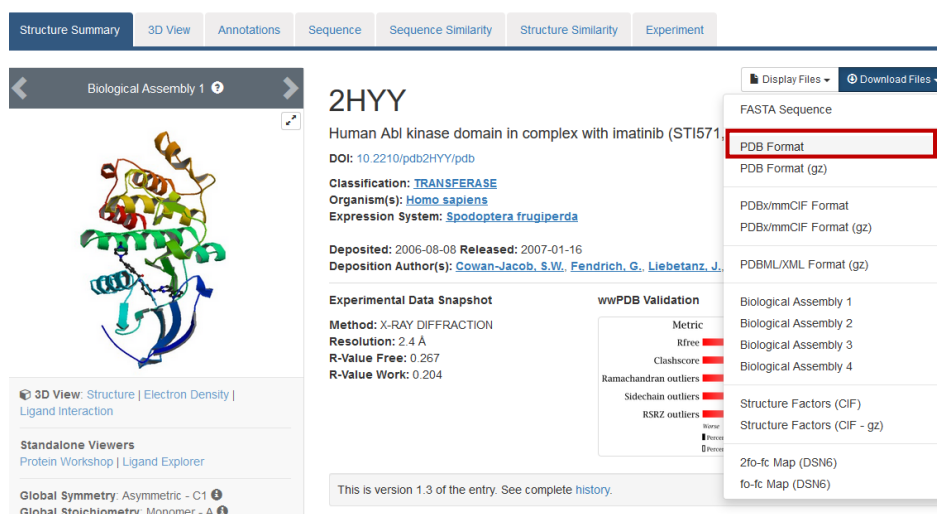
1. Acceder a la página principal de PDB (<https://www.rcsb.org/>).
2. Introducir el nombre de la proteína o el PDB Id dentro del campo de búsqueda. En este caso, **2HYY** corresponde al dominio quinasa de la proteína ABL1.

Es posible buscar la proteína en otras especies y compararlas. En este caso, la hemoglobina podría ser un buen ejemplo de biología evolutiva (Nota: la hemoglobina consta de 2 cadenas  $\sigma$  y 2 cadenas  $\beta$ ).



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 'Structures', 'Unreleased Structures', 'Citations', 'Ligands', and 'News & PDB-101 Articles'. The 'Structures' tab is selected, showing a list of results. The first result is '1FN3: CRYSTAL STRUCTURE OF NICKEL RECONSTITUTED HEMOGLOBIN-A CASE FOR PERMANENT, T-STATE HEMOGLOBIN'. The structure is shown as a ribbon diagram. The search results also include a list of organisms and a table of matches.

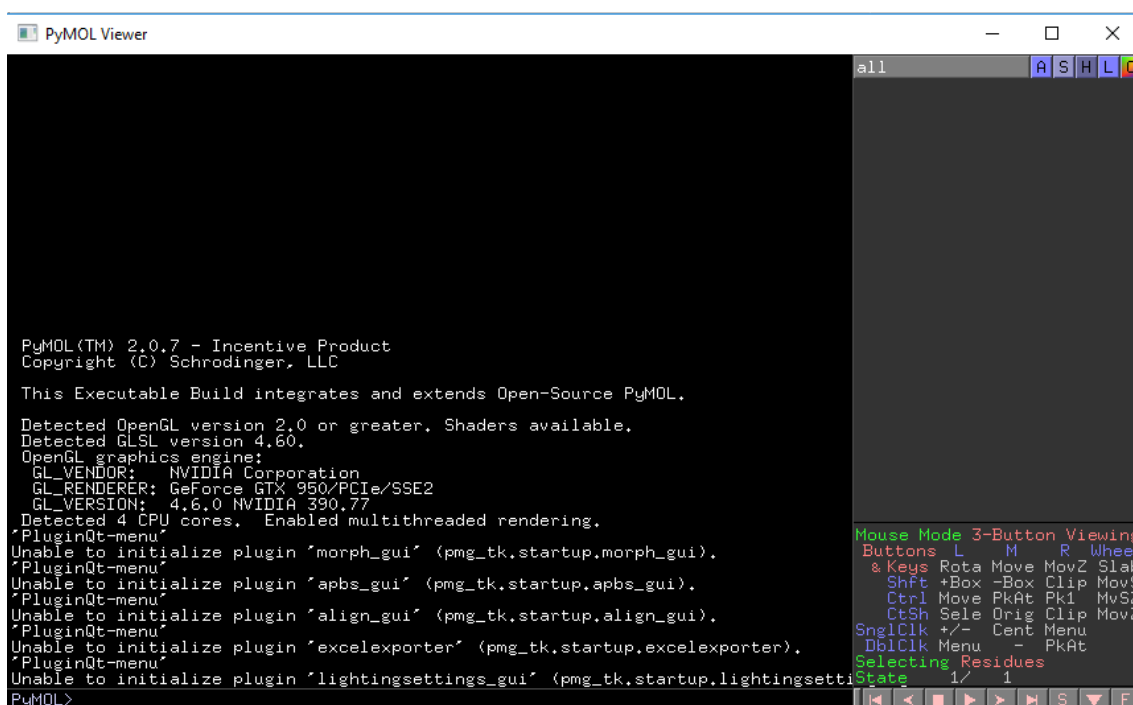
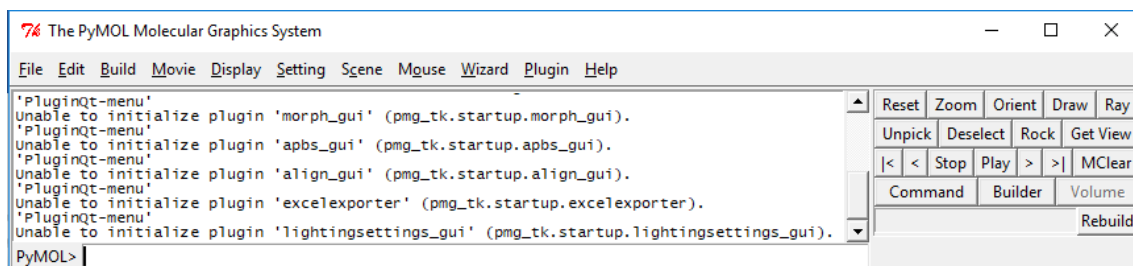
3. Descargar en formato PDB.



The screenshot shows the PDB website entry for structure 2HYY. The structure is shown as a ribbon diagram. The entry title is 'Human Abl kinase domain in complex with imatinib (STI571)'. The DOI is '10.2210/pdb2HYY/pdb'. The classification is 'TRANSFERASE'. The organism is 'Homo sapiens'. The expression system is 'Spodoptera frugiperda'. The deposition date is '2006-08-08' and the release date is '2007-01-16'. The deposition author is 'Cowan-Jacob, S.W., Fendrich, G., Liebetanz, J.'. The experimental data snapshot shows 'Method: X-RAY DIFFRACTION', 'Resolution: 2.4 Å', 'R-Value Free: 0.267', and 'R-Value Work: 0.204'. The wwPDB Validation section shows 'Metric: Rfree', 'Clashscore', 'Ramachandran outliers', 'Sidechain outliers', and 'RSRZ outliers'. The download options are shown in a dropdown menu, with 'PDB Format' selected.

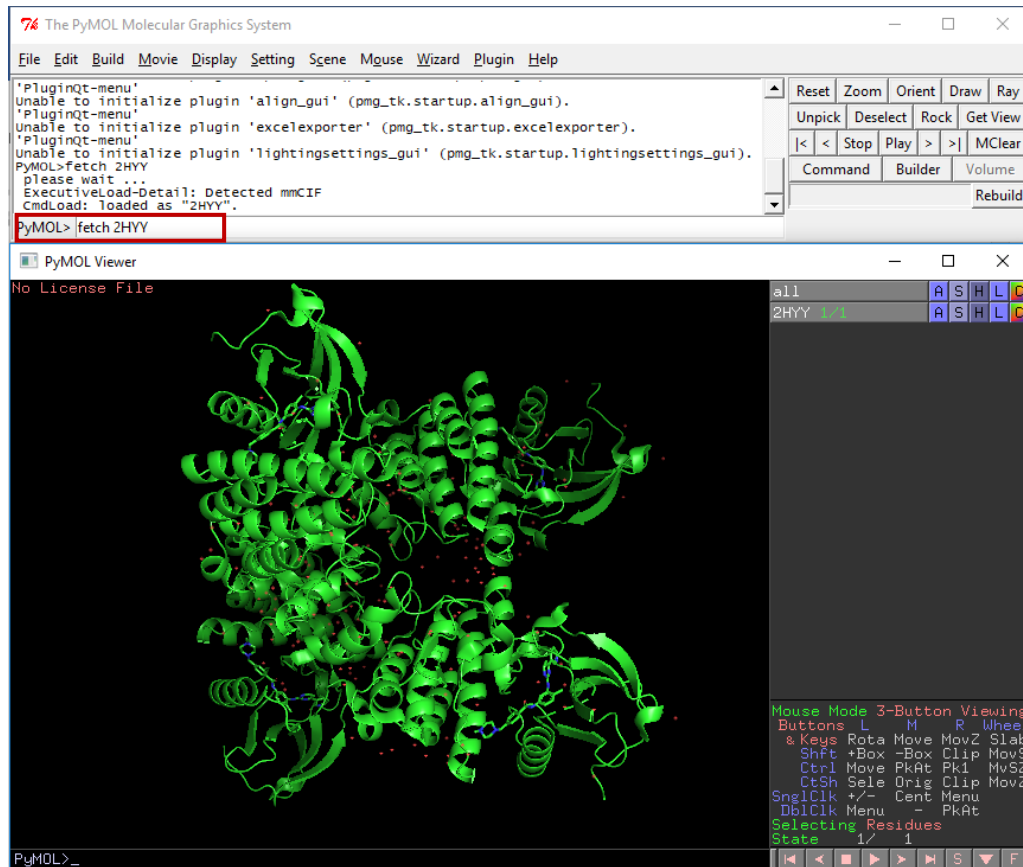
## PROCESAMIENTO PDB CON PYMOL

1. Ejecutar el programa PyMol<sup>1</sup>. En la zona inferior, se encuentra la línea de comandos.



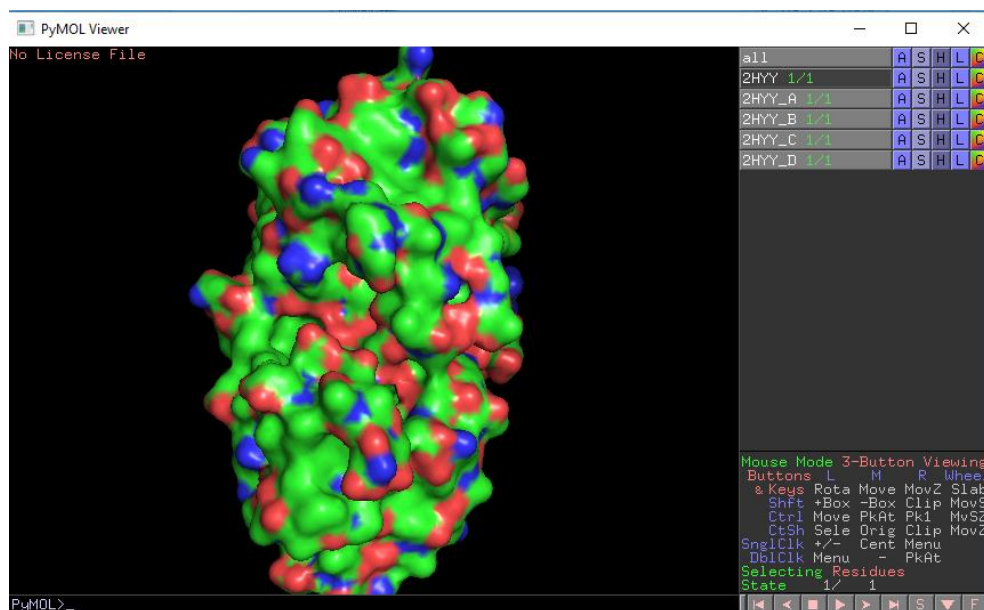
<sup>1</sup> Windows, Menu Inici: PyMol + Tcl-Tk Gui (Legacy)

## 2. Ejecutar "fetch 2HYY" en la línea de comandos



La proteína consta de 4 subunidades. En este ejemplo, se procederá a producir un archivo STL para una de las subunidades, dado que procesar toda la estructura requiere de una gran potencia de cálculo.

## 3. Ejecutar el siguiente comando "*split\_chains 2HYY; remove solvent; delete 2HYY 2HYY\_B 2HYY\_C 2HYY\_D; hide Licorice; show surface, 2HYY\_A; save 2HYY\_A.wrl;*" (copiar sin ").

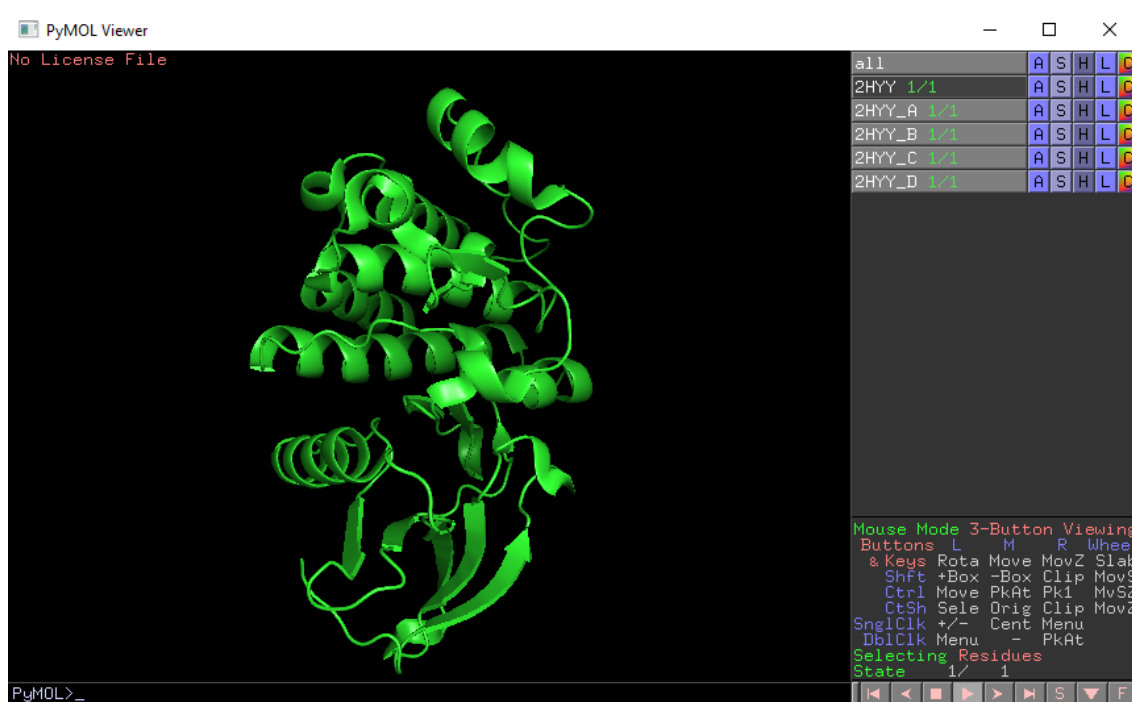


4. Dentro de la carpeta "C:\Users\ Public\ Documents", se habrá creado el fichero 2HYY\_A.wrl.

## PyMol Script

```
### PyMol 3Dprint Surface Export ###
fetch 2HYY #cargar la proteína desde PDB
split_chains 2HYY #dividir la estructura en 4 cadenas
remove solvent #eliminar el agua
delete 2HYY 2HYY_B 2HYY_C 2HYY_D #eliminar cadenas B, C, D i la estructura original
hide licorice #esconder el ligando
show surface, 2HYY_A #mostrar la superficie hidrofóbica de la proteína
hide cartoon, 2HYY_A #esconder visualización alfa hélice i lamina beta
set solvent_radius, 2.0 # modificar el radio del solvente, 1.4 Å per defecto
save 2HYY_A.wrl #salvar como fichero wrl
```

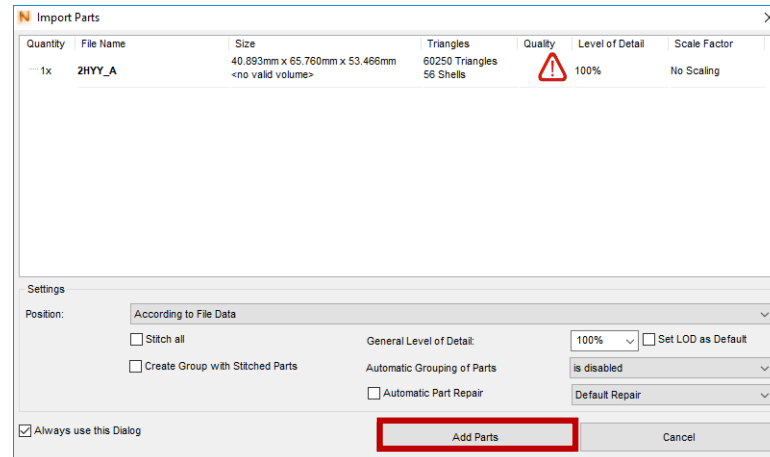
Es posible exportar la proteína para visualizar diferentes dominios, como las hélices  $\alpha$  o las láminas  $\beta$ . Si se desea, se pueden modificar los parámetros de estos dominios antes de exportarlo.



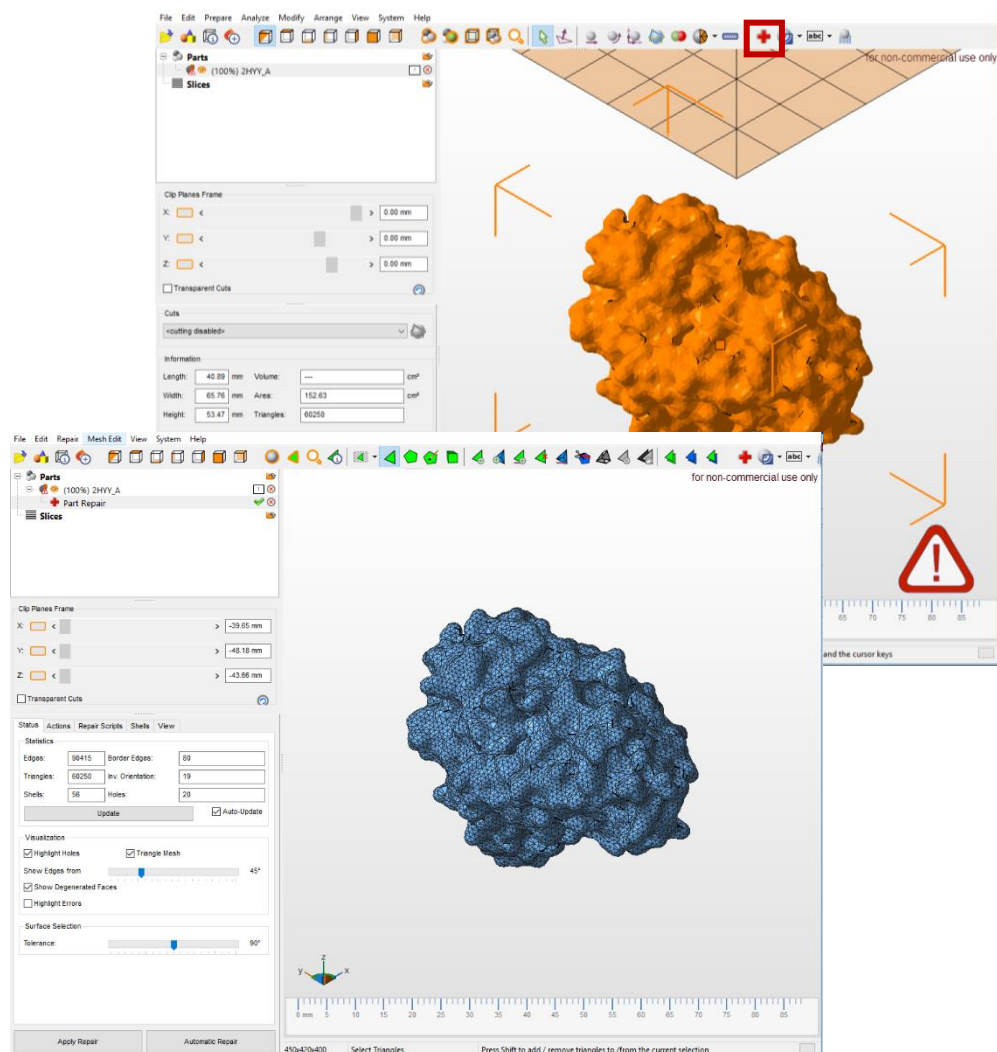
## POST-PROCESAMIENTO

En este apartado se procederá a la reparación de la malla del modelo tridimensional

1. Ejecutar Netfabb.
2. Abrir el archivo 2HYY\_A.wrl, lo que dará lugar a un error. Hacer clic en **Add Parts**.

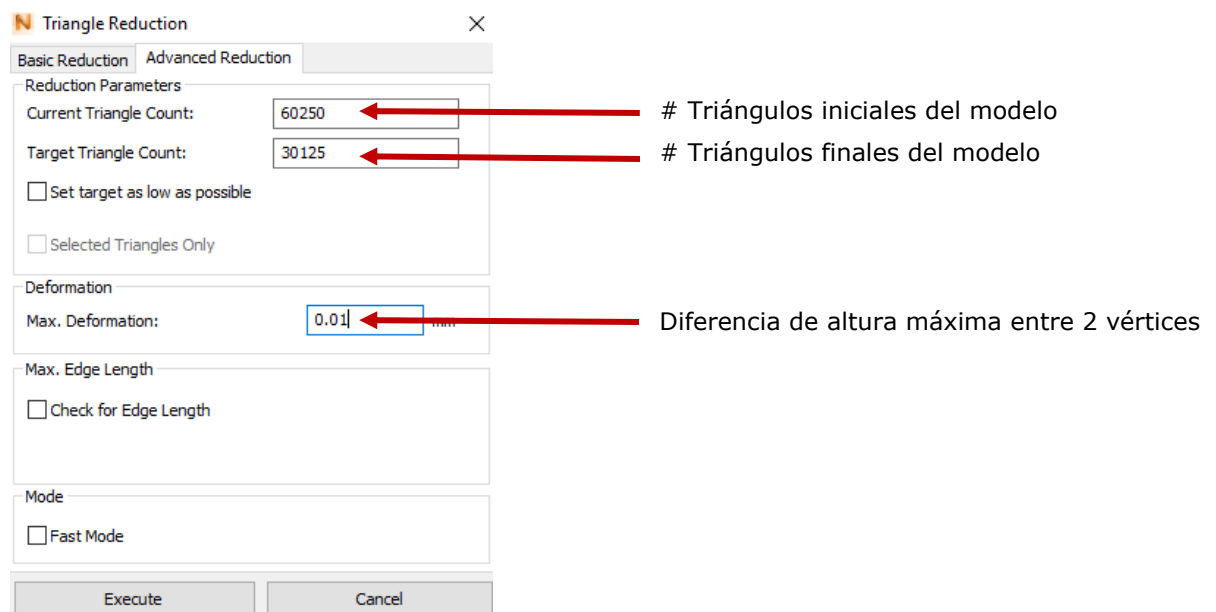
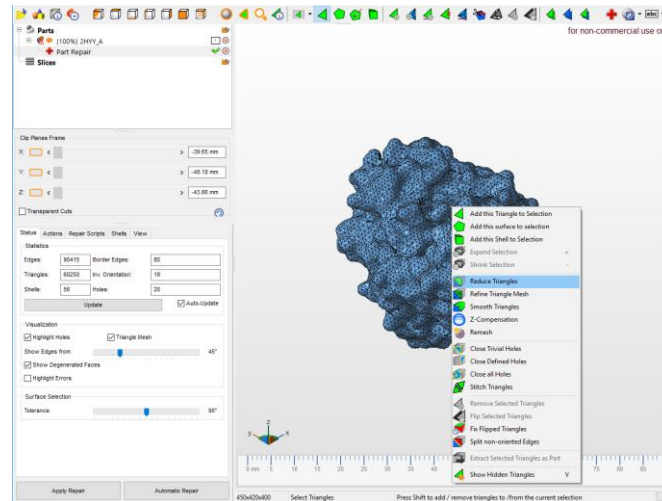


3. Ejecutar **Repair**.

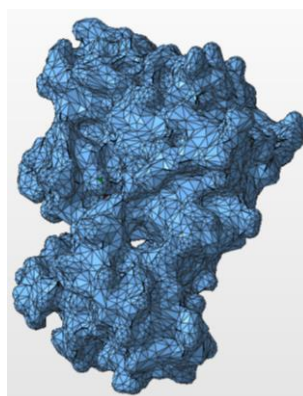




4. Hacer clic con el botón secundario y elegir **Reduce Triangles**. El objetivo es reducir el número de triángulos que componen el modelo tridimensional, para facilitar su manejo e impresión. Este paso permite modificar la apariencia de la proteína. Se recomienda jugar con los diferentes parámetros. Con la ayuda de Control + Z se pueden deshacer los cambios propuestos.

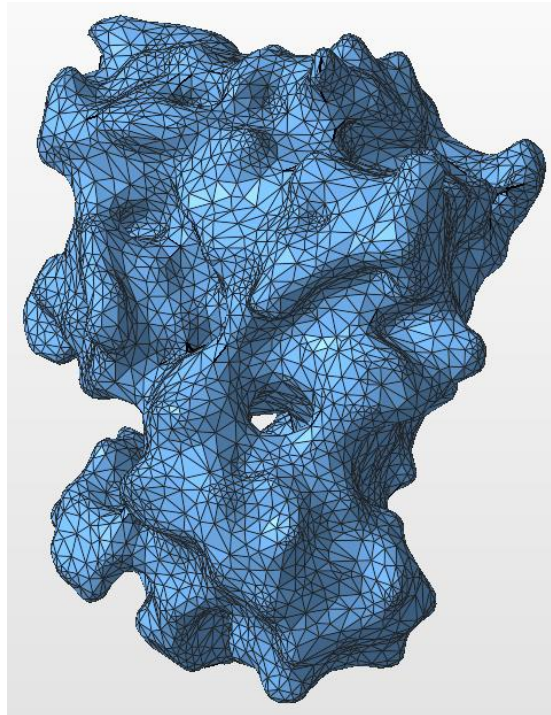


Una propuesta es utilizar **Target Triangles Count** 20,000 y **Max. Deformation**: 1.0 mm

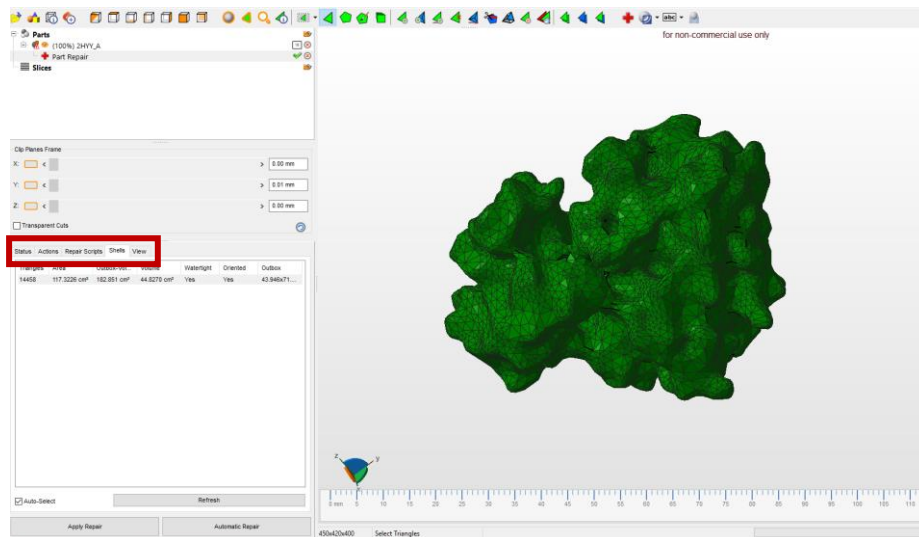




5. Es posible suavizar los polígonos por medio de **Smooth Triangles**. En el ejemplo se ha utilizado un valor **Strenght** 1.4 Iteration.

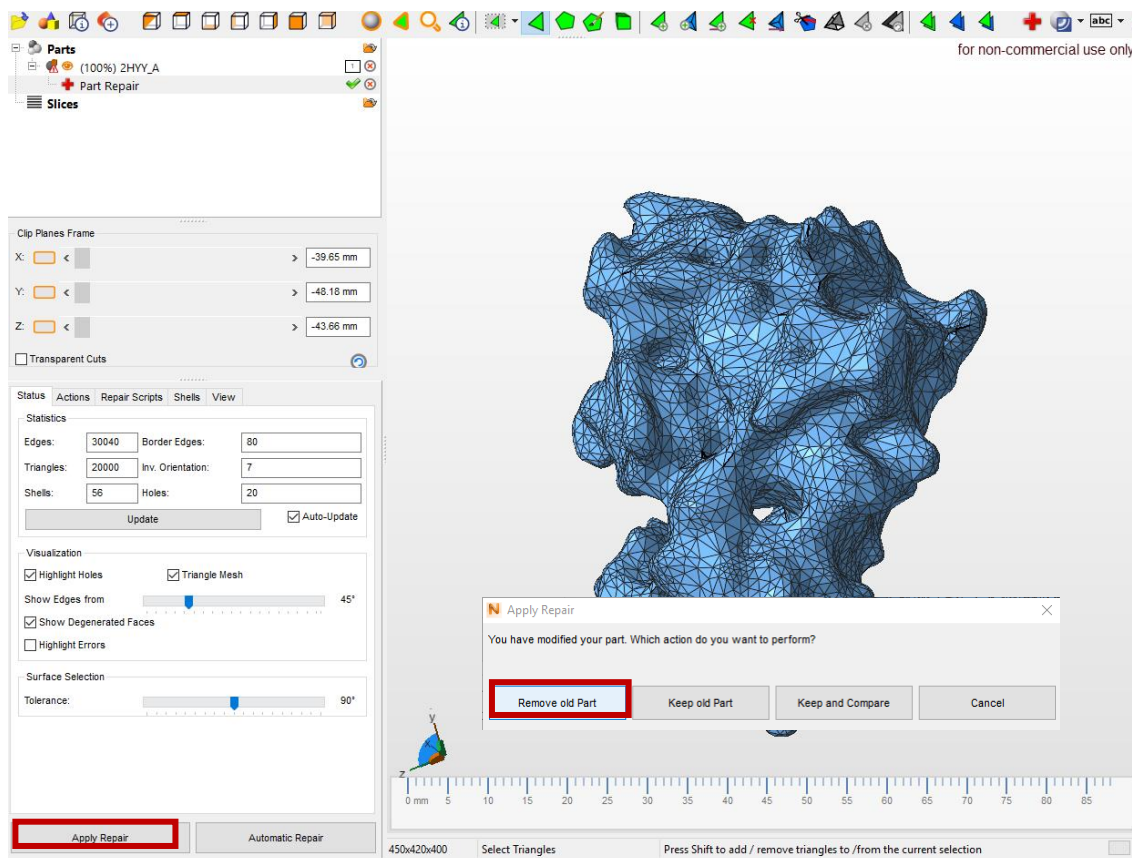


6. Comprobar que el modelo existe como un cuerpo sólido. La pestaña **Shells** sólo debe mostrar un objeto.

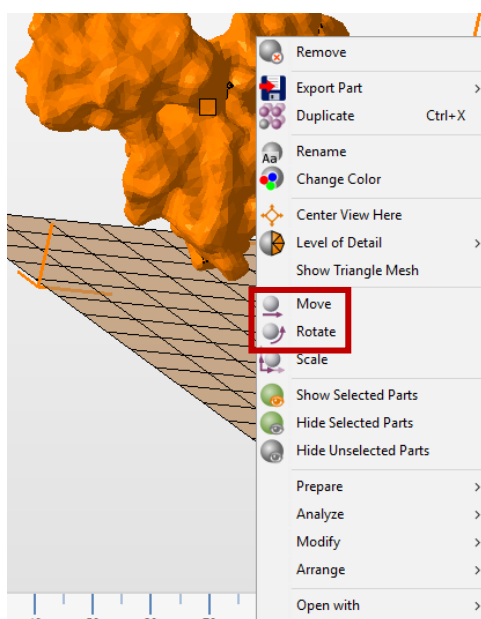


Status	Actions	Repair Scripts	Shells	View		
Triangles	Area	Outbox-Vol...	Volume	Watertight	Oriented	Outbox
14458	117.3226 cm²	182.851 cm³	44.8270 cm³	Yes	Yes	43.946x71....

- Una vez alcanzada la forma deseada, hay que aceptar los cambios (**Apply Repair**). El programa preguntará si queremos sustituir el modelo importado adicionalmente (**Remove old Parte**).

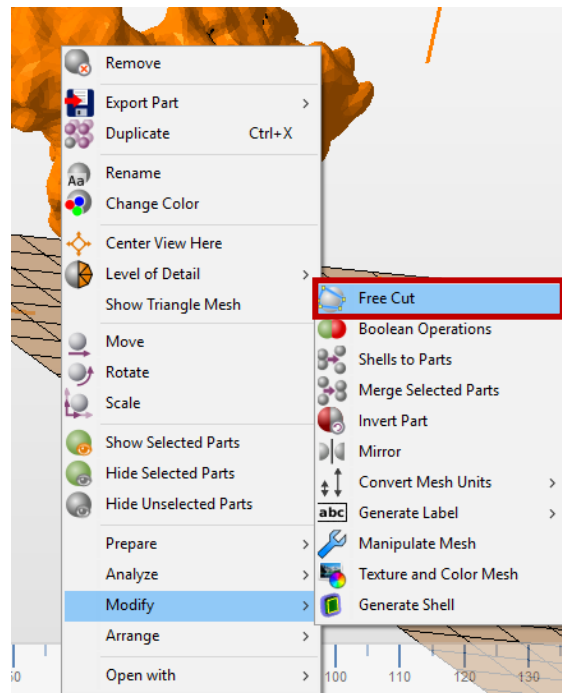


- Mediante los comandos **Move** y **Rotate** podemos colocar el modelo en la posición y eje que interese para facilitar el corte y su posterior impresión.

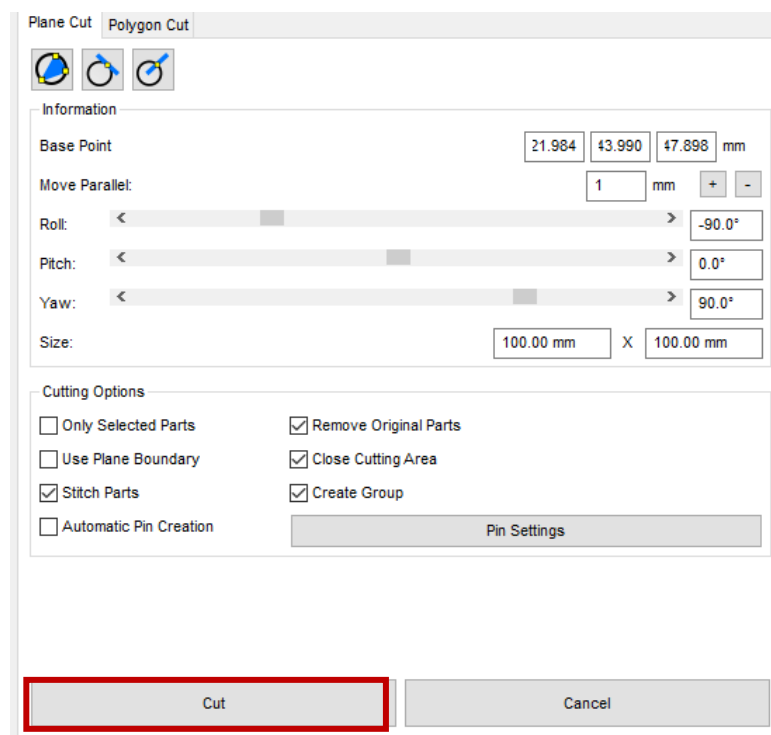


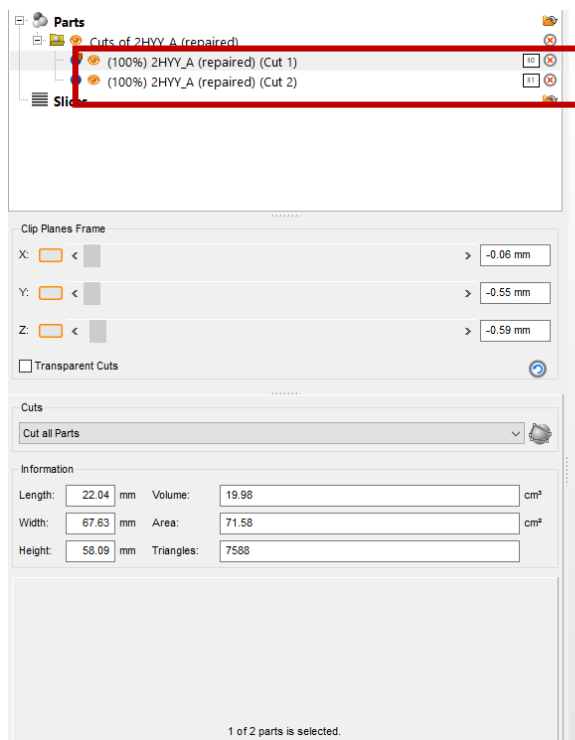
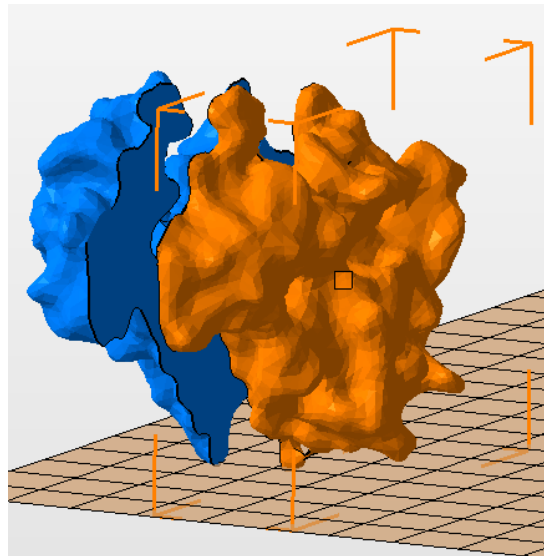
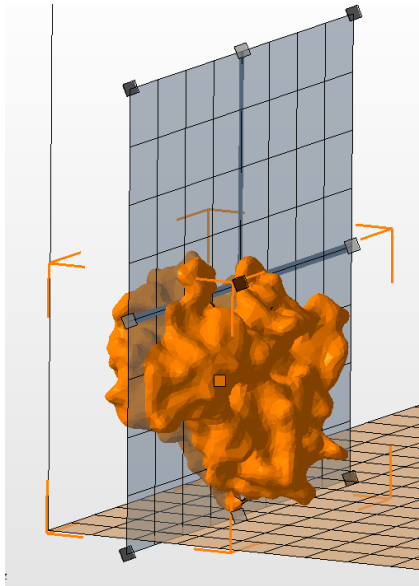
El objeto ya puede ser exportado en STL para ser impreso. Se recomienda utilizar *rafts* y soportes para su impresión. Sin embargo, si se desea tener un modelo donde poder introducir el ligando, es necesario dividir el modelo tridimensional.

9. Con el botón secundario, clicar sobre el modelo y seleccionar **Modify -> Free Cut**

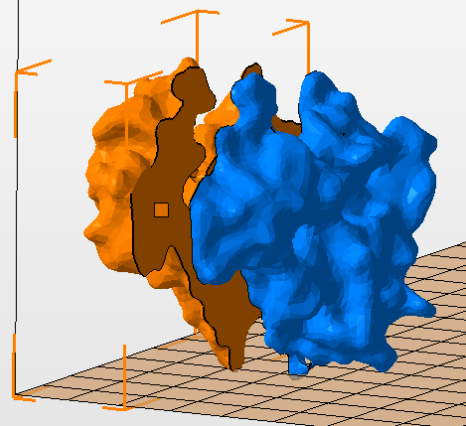


10. En la pestaña **Plane Cut** se encuentran las opciones para generar un plan de corte. En este caso, la referencia es el bolsillo hidrofóbico.

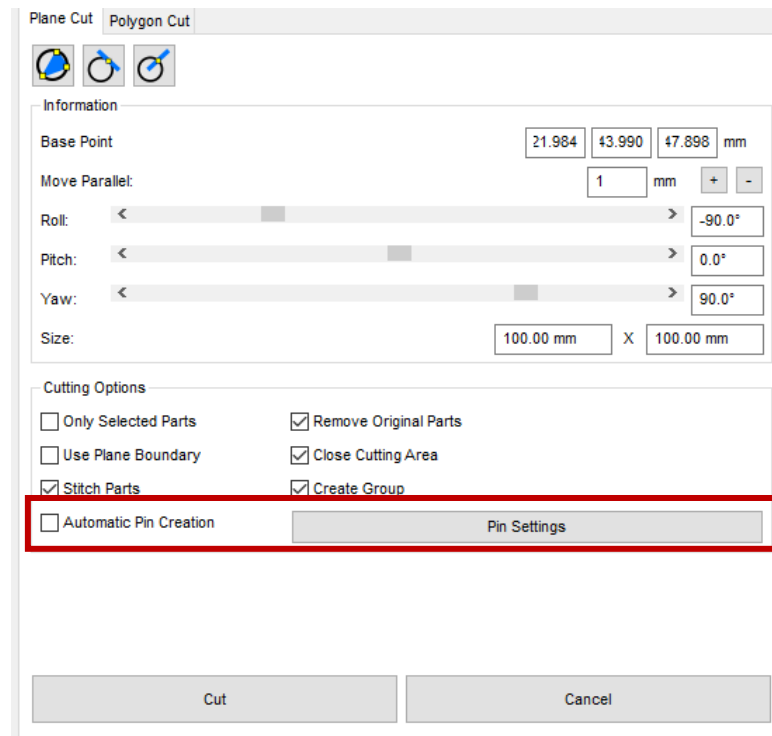




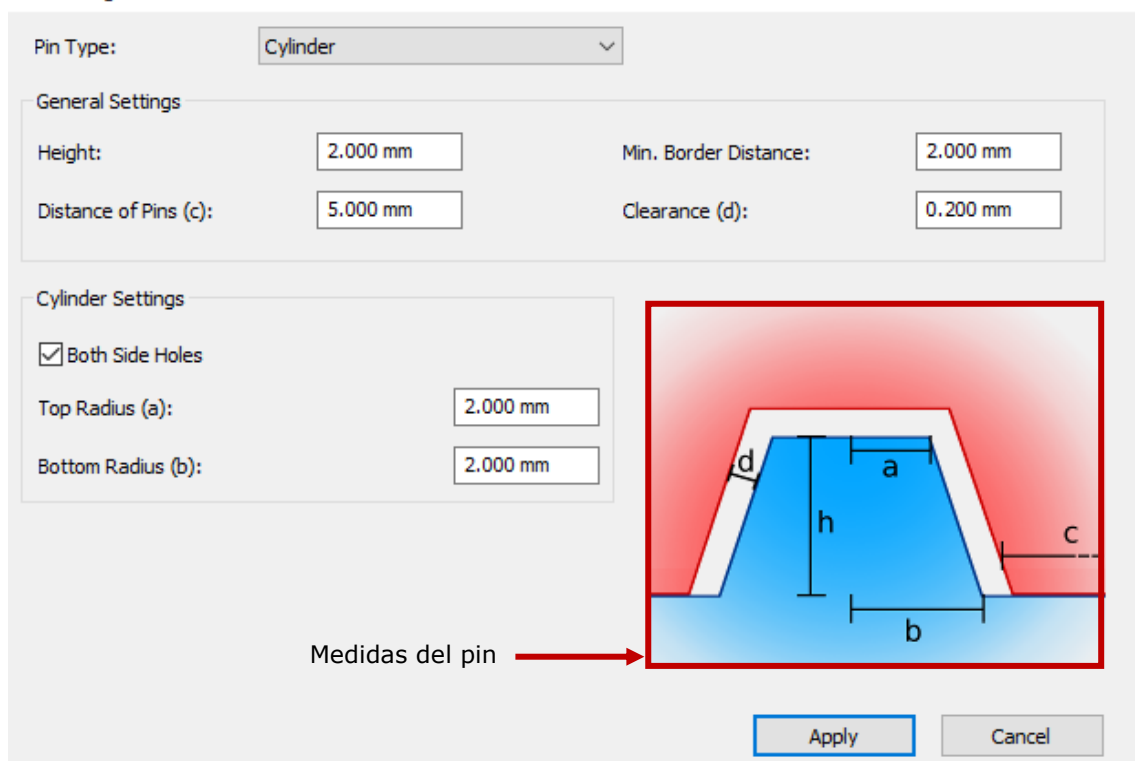
Modelo dividido en 2 partes



11. En caso de querer añadir anclajes, hay que marcar la opción **Automatic Pin Creation** e indicar las características del pin dentro de **Pin Settings**.



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

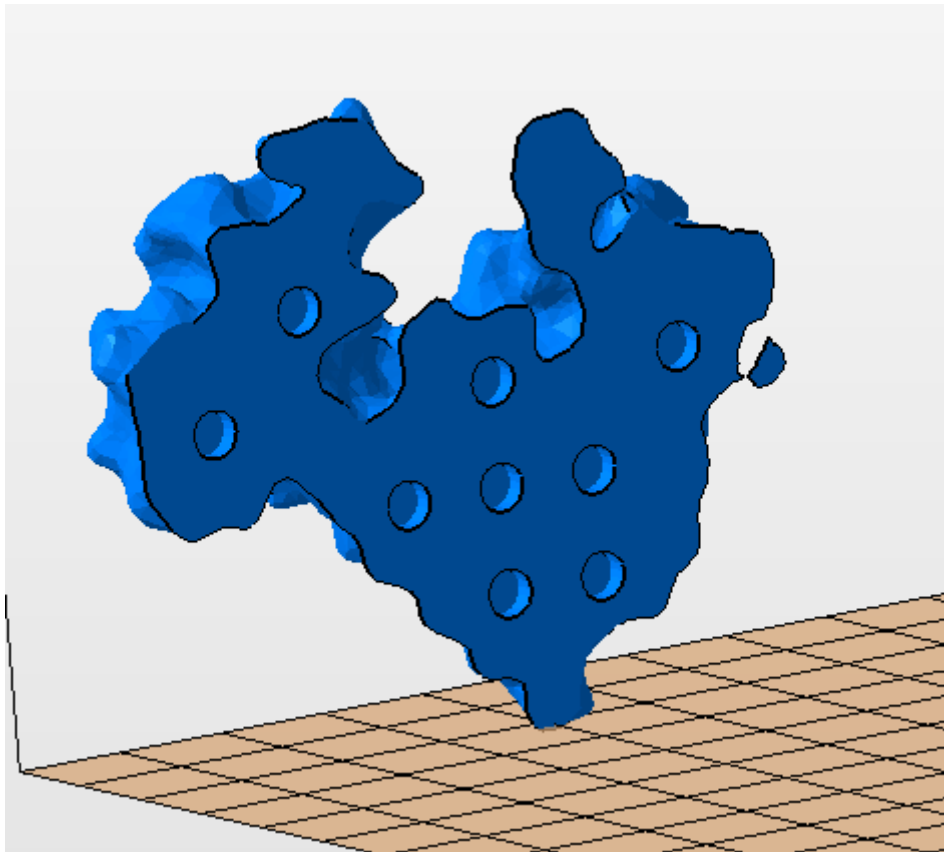
☒ Both Side Holes

Top Radius (a): 2.000 mm

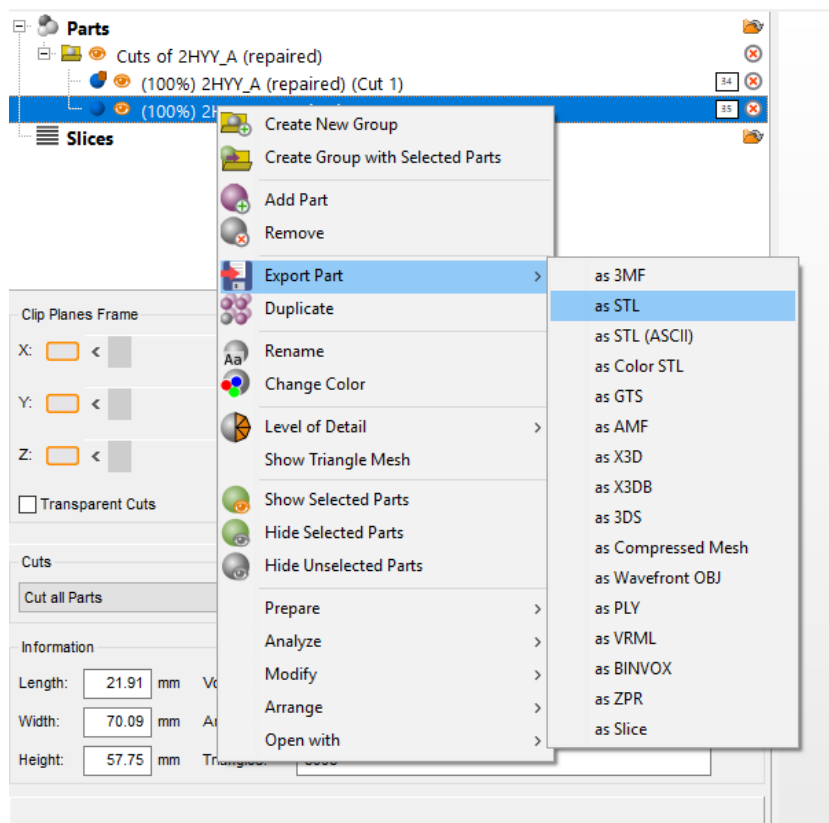
Bottom Radius (b): 2.000 mm

Medidas del pin →

Apply Cancel

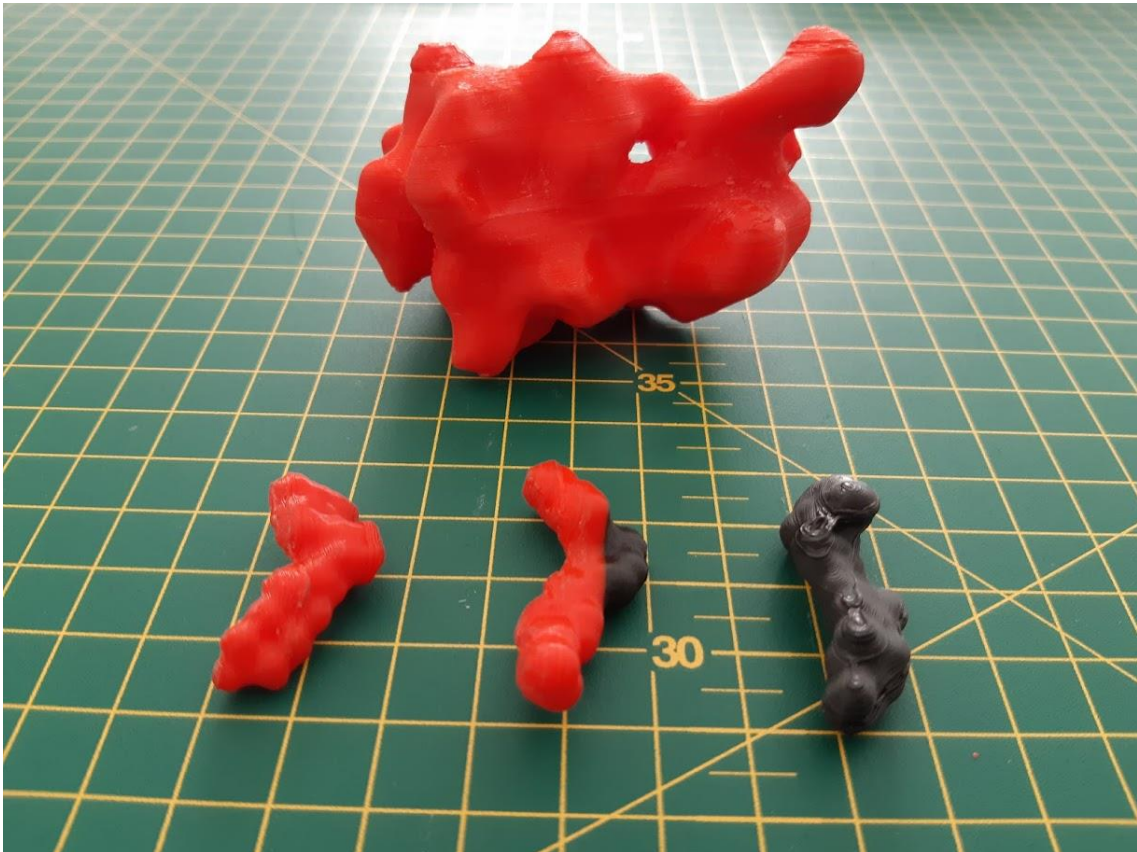


12. Exportar cada mitad como STL.





13. Exportar como STL e 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.