

## PREDIKSI EFEKTIVITAS INTERAKSI ANTARA ANTIBODI DAN VAKSIN H1N1 MELALUI METODE *MOLECULAR DOCKING* SECARA *IN SILICO*

Susanty

Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknik Universitas Muhammadiyah Jakarta  
Jl. Cempaka Putih Tengah 27, Jakarta Pusat  
[Susanty\\_39@yahoo.co.id](mailto:Susanty_39@yahoo.co.id)

### ABSTRAK

Flu babi H1N1 merupakan penyakit menular akibat virus influenza tipe A yang telah menjadi pandemik dan mortalitasnya sangat tinggi pada manusia. Pemberian vaksin menjadi salah satu upaya pencegahan penyakit tersebut. Bagian antigenik (*epitope*) virus H1N1 digunakan untuk merancang suatu vaksin. Beberapa *epitope* telah diprediksi dari perwakilan protein *hemagglutinin* (HA), *neuramidase* (NA), dan *matriks 2* (M2) virus H1N1. Pendekatan *in silico* dilakukan melalui kombinasi prediksi antigen pada tahapan respons imun, yaitu *proteasomal cleavage* (NetChop), *Transporter Antigen Processing* (TAP) *binding* (TAPPred), dan *Major Histocompatibility Complex* (MHCpred). Upaya meningkatkan respons imun juga dilakukan dengan memprediksi *epitope* sel B menggunakan server DiscoTope (*conformational epitope*) dan BepiPred (*sequential epitope*). Enam model vaksin, yaitu NHM, MHN, HNM, MNH, HMN, dan NMH diperoleh dari 21 kombinasi terbaik *epitope* sel T dan sel B sebagai representasi variasi *allele Human Leukocyte Antigen* (HLA) dan protein virus H1N1 sehingga diharapkan mampu memberikan respons imun. Struktur 3D vaksin diprediksi dan dimodeling menggunakan server CPHModels dan program *Swiss-Pdb Viewer* (*Deep View*). Hasil struktur 3D vaksin dievaluasi menggunakan Ramachandran Plot, BLASTp (database PDB virus), dan FeatureMap 3D. Vaksin terdiri dari 258 asam amino dan memiliki lebih dari 50 % kesamaan struktur 3D dengan protein dalam database. Proses akhir efektivitas antibodi terhadap vaksin diuji melalui *molecular docking* antara vaksin dengan antibodi dalam database, diperoleh 14 *clustering* dengan waktu yang dibutuhkan sekitar 18 detik dan data energi minimum interaksi didapatkan antara antibodi terhadap vaksin NHM sebesar -13,6859 kkal/mol.

**Kata kunci:** antibodi, antigen, vaksin, flu babi (H1N1), *in silico*, *molecular docking*.

### ABSTRACT

*Swine flu H1N1 is one of the disease due to influenza the A virus that has become pandemic and very high mortality to human. A vaccination is one of the prevention of this disease. Antigenic part (epitope) of the H1N1 virus is used to designing a vaccine. Some have predicted epitope of representatives from protein hemagglutinin (HA), neuramidase (NA), and matriks 2 (M2) of H1N1 virus. In silico approach was undertaken through a combination of input stages by immune respons, yaitu proteasomal cleavage (NetChop), Transporter Antigen Processing (TAP) binding (TAPPred), dan Major Histocompatibility Complex (MHCpred). An effort to improve The immune response is also inducted to predict the B-cell epitope using DiscoTope (conformational epitope) dan BepiPred (sequential epitope) server. Six vaccines, NHM, MHN, HNM, MNH, HMN, dan NMH vaccines are the best combination of 21 B-cell epitope and T-cell variations in allele Human Leukocyte Antigen (HLA) and the protein of H1N1 virus are expected to provide the immune respons. The 3D stucture and predicted vaccine bas modeled By CPHmodels program And the Swiss-PDB Viewer (Deep View). The resultan of 3D structure of vaccines are evaluated using the Ramachandran Plot, BLASTp (protein database human), and FeatureMap 3D. Vaccine consist of 258 amino acids and have more than 50 % similarity with 3D structure of protein in the database. The last preformed molecular docking between*

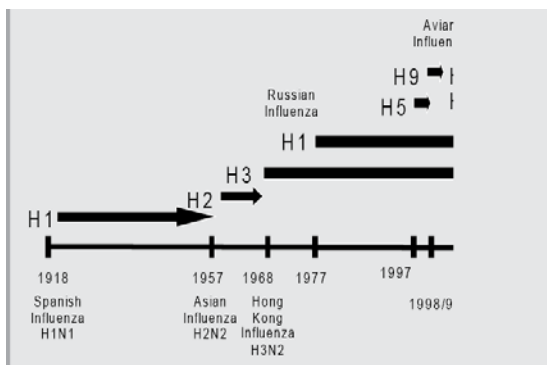
*vaccine and antibody was found in the database received 14 of clustering with the time needed about 18 seconds and the minimum energy was found in antibody interaction with NHM vaccine was - 13,6859 kkal/mol.*

**Keywords:** *antibody, antigen, vaccine, swine influenza (H1N1), in silico, molecular docking.*

## PENDAHULUAN

Penyakit flu babi (swine influenza) adalah suatu penyakit menular yang disebabkan oleh virus influenza tipe A, khususnya sub tipe H1N1. Flu babi menular dari babi ke babi, babi ke manusia, dan manusia ke manusia. Penularan virus tersebut dapat terjadi melalui kontak hidung antar babi atau melalui pengeringan mukus. Penularan melalui udara juga dapat terjadi ketika babi batuk atau bersin. Virus influenza pada umumnya tidak meyerang manusia, namun terbukti virus tersebut dapat menyerang manusia. Gejala-gejala klinis yang ditemui seperti gejala flu umumnya, yaitu demam, sakit tenggorokan, batuk, nyeri otot, sakit kepala, lemas, muntah-muntah, sulit bernafas, dan berakhir pada kematian.

Penyakit flu babi H1N1 pertama kali terjadi pada tahun 1918 dikenal sebagai “*Spanish Flu*” menyebabkan kematian lebih dari 50 juta manusia di seluruh dunia dan dinyatakan sebagai wabah pandemik dalam kurun waktu satu tahun, yaitu tahun 1918-1919. Pandemi kedua terjadi pada tahun 1957 dikenali sebagai H2N2 menyerang kawasan asia atau “*Asian Flu*” menyebabkan kematian kurang lebih 1 juta manusia. Pandemi ketiga pada tahun 1968, “*Hongkong Flu*” disebabkan oleh virus influenza A H3N2 menewaskan 700.000 manusia (Gambar 1).



Gambar 1. Beberapa sub tipe virus influenza A menjadi penyebab wabah pandemik (Radji, 2006)

Sebanyak 327 kasus infeksi *avian influenza* H5N1 di dunia dengan angka kematian rerata 60,96 % mayoritas terjadi di Indonesia, Vietnam, dan Thailand, serta Cina pada tahun 2003 (<http://www.who.int>).

Kasus-kasus yang disebabkan oleh virus influenza A terus bermunculan. Data terakhir WHO sampai bulan Juni 2009, jumlah kasus influenza A H1N1 di seluruh dunia telah mencapai 59.814 kasus termasuk 263 menyebabkan kematian (<http://www.who.int/csr/disease/swineflu/en/>).

Usaha untuk menekan tingginya angka kematian yang disebabkan oleh virus H1N1 memerlukan suatu tindakan pencegahan dini melalui vaksinasi. Penelitian telah banyak dilakukan dalam rangka mendapatkan vaksin H1N1. Namun terapi lebih banyak digunakan berupa obat antivirus yang hanya berfungsi sebagai inhibitor dalam proses replikasi virus dalam sel inang. Vaksin H1N1 untuk manusia sangat sulit dihasilkan terkait virus H1N1 mudah bermutasi melalui *antigenic drift* dan *reassortment*.

Salah satu alternatif vaksin H1N1 untuk mencegah penyebaran virus adalah vaksin peptida. Vaksin peptida terdiri dari sekuens-sukuens peptida penyusun protein permukaan virus dan bersifat antigenik (dapat memicu timbulnya respon imunitas).

Tujuan penelitian adalah merancang vaksin H1N1 secara *in silico* dan memprediksi energi minimum interaksi antara vaksin dan antibodi manusia yang terdapat pada *database* melalui metode *molecular docking*. Beberapa *epitope* diseleksi dari virus H1N1 yang diprediksi akan memberikan respon imunitas T *cell* dan B *cell*. Protein yang digunakan sebagai *source epitope* adalah *hemagglutinin*, *neuraminidase*, dan membran protein M2 dari virus H1N1 baik pada inang manusia dan babi di Indonesia.

## METODE

*Database* merupakan sumber data penelitian. Alamat situs *database* diakses secara bebas menggunakan seperangkat komputer terhubung internet. Sistem operasi yang digunakan adalah *Microsoft Windows XP Professional* dengan browser *Mozilla FireFox* versi 3.1 beta 1.

### Pencarian Sekuen Protein HA, NA, dan M2 Virus H1N1

Pencarian data sekuen protein *hemagglutinin* (HA), *neuraminidase* (NA), dan matrik 2 (M2) virus H1N1 pada inang manusia dan babi dilakukan melalui *server GenBank Influenza Virus Resource* (IVR-NCBI). *Homepage server* IVR-NCBI dapat diakses pada alamat situs: <http://ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/Database.html>. Format sekuen yang dipakai untuk menyimpan sekuen protein HA, NA, dan M2 adalah format FASTA karena format tersebut paling banyak digunakan untuk analisis pada *software-software* selanjutnya dibandingkan format GBFF. Sekuen protein terdiri dari urutan huruf-huruf, setiap huruf merupakan kode dari suatu asam amino.

### Multiple Sequence Alignments

Sekuen protein HA, NA, dan M2 virus H1N1 inang manusia dan babi dalam format FASTA dimasukkan sebagai *input* ke dalam *server ClustalW2* yang tampilan *homepage server* tersebut dapat diakses secara *on line* pada situs: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>. Melalui *server* tersebut dilakukan penyejajaran terhadap setiap protein HA, NA, dan M2 virus H1N1. Kemudian ditentukan perwakilan sekuen protein HA, NA, dan M2 berdasarkan skor tertinggi untuk digunakan sebagai *input* analisis selanjutnya.

### Prediksi Proteosomal Cleavage Protein HA, NA, dan M2 Virus H1N1

*Proteosomal cleavage* diprediksi dengan menggunakan *server NetChop* yang dapat diakses bebas melalui internet dengan alamat situs *homepage* <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetChop/>. *Server NetChop* membutuhkan *input* data berupa sekuen protein untuk dapat memprediksi *proteosomal cleavage* protein HA, NA, dan M2 virus H1N1 inang manusia dan babi. Hasil

prediksi *proteosomal cleavage* oleh *NetChop* adalah berupa sekuen peptida serta skor prediksi *cleavage* tiap sekuen peptida.

### Prediksi TAP Binding Protein HA, NA dan M2 Virus H1N1.

TAP (*Transporter Antigen Processing*) *binding* diprediksi dengan menggunakan *server TAPPred* yang dapat diakses bebas melalui internet dengan alamat situs *homepage* <http://bioinformatics.coms.edu/mirror/tappred/>. Hasil prediksi TAP *binding* oleh *server TAPPred* adalah berupa sekuen peptida beserta posisinya serta skor prediksi afinitas *binding* untuk tiap sekuen peptida.

### Prediksi Epitope sel T Protein HA, NA, dan M2 Virus H1N1.

Prediksi *epitope* sel T protein HA, NA, dan M2 virus H1N1 inang manusia dan babi didasarkan atas skor *binding* terbesar. Hasil prediksi terdiri atas dua kelas MHC, yaitu MHC Kelas I dan MHC Kelas II. Seleksi kandidat peptida penyusun vaksin dilakukan dari hasil prediksi *epitope* sel T protein HA, NA, dan M2 virus H1N1. SVMHC memprediksi *epitope* sel T dengan data *input* sekuen asam amino protein HA, NA, dan M2 dalam format FASTA. *Epitope* MHC kelas I dan MHC kelas II diprediksi melalui *server SVMHC* dengan alamat situs *homepage* [http://www-bs.informatik.uni-tuebingen.de/SVMHC/](http://www.bs.informatik.uni-tuebingen.de/SVMHC/)

### Prediksi Epitope sel B Protein HA, NA, dan M2 Virus H1N1

Prediksi *epitope* sel B protein HA, NA, dan M2 virus H1N1 inang manusia dan babi dilakukan melalui *server BepiPred* melalui situs *homepage* <http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb> *input* dan *server DiscoTope* melalui situs *homepage* <http://tools.immuneepitope.org/stools/discotope> /discotope.do

### Penentuan Sekuen Vaksin

Penentuan sekuen vaksin hasil prediksi sel T didasarkan dari skor peptida-peptida hasil prediksi *server SVMHC*, *NetChop*, dan *TAPPred*. Sekuen vaksin yang dirancang berupa sekuen peptida dalam format FASTA. Penentuan sekuen vaksin dilakukan melalui kombinasi peptida atas dasar hasil prediksi *epitope* sel B dan sel T. *Epitope* yang digunakan untuk kombinasi adalah *epitope* sel

T (MHC-I dan MHC-II) dan *epitope* sel B adalah yang mempunyai skor *binding* paling tinggi (*high-binder*).

### Pencarian *Template*.

Pencarian *template* dilakukan melalui *server CPHModels* yang terkoneksi secara langsung dengan *database* PDB melalui koneksi internet. *Homepage server CPHModels* dapat diakses pada situs <http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/>. Pencarian *template* dilakukan untuk protein HA, NA, dan M2 virus H1N1.

### Modeling Struktur Tersier Vaksin

*Modeling* struktur tersier vaksin berdasarkan *template* dilakukan melalui program *Swiss-PdbViewer/DeepView*. Residu-residu penyusun struktur dapat dilihat melalui menu *Control Panel*. Pelekatan struktur vaksin pada *template* dilakukan melalui menu *Magic Fit*. Residu-residu yang melekat dapat dilihat melalui menu *alignment*. Visualisasi struktur tersier vaksin hasil pelekatan dilakukan dengan memindahkan struktur tersier *template*, sehingga terlihat struktur tersier vaksin. Perbaikan struktur tersier vaksin dilakukan dua tahap. Tahap pertama adalah perbaikan struktur vaksin pada *viewer DeepView* dengan memperbaiki residu-residu yang saling tumpang tindih. Sedangkan tahap kedua adalah melalui *server Swiss-Model* dengan cara mengirim struktur masing-masing vaksin yang telah diperbaiki pada *DeepView* ke *server Swiss-Model* dalam bentuk PDB untuk dilakukan pengoptimalan struktur, yaitu dengan cara memilih menu *Optimise Mode* pada *server Swiss-Model*.

### Evaluasi Struktur Tersier Vaksin

Evaluasi struktur tersier vaksin dilakukan dengan melihat residu yang saling tumpang tindih dan menganalisis *Ramachandran Plot* struktur vaksin melalui menu *Ramachandran Plot* pada program *DeepView*.

### Pembandingan Struktur Tersier Vaksin dengan *Database*

Pembandingan struktur tersier masing-masing vaksin dengan *database* protein dalam bentuk PDB dilakukan melalui *FeatureMap3D* pada situs *Center for Biological Sequence Analysis* (CBS). Alamat situs *homepage* dapat

diakses di <http://cbs.dtu.dk/services/FeatureMap3D>.

### Validasi Vaksin dengan *Database*

Validasi sekuen vaksin dengan *database* menggunakan BLASTp terhadap *database* protein *human* dan data PDB virus influenza A. Alamat situs *homepage* dapat diakses di <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

### Molecular Docking

Prediksi molekular docking antara antigen (ligan) dengan antibodi pada manusia (*reseptor*) dilakukan menggunakan *software* Arguslab 4.0.1. Sebelum memulai docking, diunduh terlebih dahulu *file* PDB yang memiliki kesamaan dengan sekuen vaksin. diunduh juga *file* PDB yang berisikan *database* antibodi virus H1N1.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Pencarian Sekuen Protein HA, NA, dan M2 Virus H1N1

Sekuen protein virus H1N1 yang dicari adalah sekuen protein *hemagglutinin* (HA), *neuraminidase* (NA), dan matrik 2 (M2). Protein HA dan NA merupakan komponen spesifik *antigenic* untuk menginduksi respon sistem imun terhadap subtipe H1N1, sedangkan protein M2 merupakan komponen *conserved antigenic* untuk menginduksi respon sistem imun terhadap *virus influenza* tipe A. Pencarian sekuen protein HA, NA, dan M2 dilakukan melalui *server GenBank Influenza Virus Resource* (IVR-NCBI) dengan alamat situs *homepage*

<http://ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/Database.html> yang dapat diakses bebas melalui koneksi internet. *Database* dalam *GenBank* merupakan data yang lengkap karena tidak hanya memuat sekuen dan keterangan-keterangan mengenai protein, namun juga memuat sekuen *nucleotide* dari protein tersebut. Agar lebih memudahkan penggunaannya dalam *software* maupun *server* dalam penelitian, semua sekuen protein diubah ke dalam format FASTA.

Sekuen protein yang diperoleh melalui *server GenBank Influenza Virus Resource* (IVR-NCBI) terlalu banyak, sehingga perlu dilakukan seleksi dan pengelompokan data. Seleksi dilakukan melalui pengurangan sekuens identik dan menggunakan sekuens *full-length*. Sedangkan pengelompokan data dilakukan untuk memudahkan *multiple alignment*. Setelah

dilakukan seleksi dan pengelompokan data didapat hasil berikut:

- HA inang manusia : 36 sekuens (dari 753 sekuens)
- HA inang babi : 21sekuens (dari 170 sekuens)
- NA inang manusia : 30 sekuens (dari 713 sekuens)
- NA inang babi : 17 sekuens (dari 155 sekuens)
- M2 inang manusia : 20 sekuens (dari 182 sekuens)
- M2 inang babi : 11 sekuens (dari 87 sekuens)

### Multiple Sequence Alignments

Data yang telah diseleksi dan dikelompokkan dimasukkan sebagai input *multiple alignment*. Tujuan *alignment* untuk melihat perbedaan sekuen protein dan untuk menentukan satu perwakilan protein HA, NA,

dan M2 virus H1N1 pada inang manusia dan babi. *Server* yang digunakan untuk *multiple alignments* adalah ClustalW2. *Server* dapat diakses secara *on line* pada situs *homepage* <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2>

*Display* hasil *multiple alignments* pada ClustalW2 terdiri atas kode (\*), (:), dan (.) (Tabel 1). Tanda (\*) menandakan *conserve column* atau kesamaan asam amino pada satu kolom, tanda (:) menandakan bahwa ada kemiripan ukuran dan kesamaan kelarutan dalam air (hidrofilik atau hidrofobik) pada satu kolom, dan tanda (.) menandakan bahwa kemiripan ukuran sifat kelarutan dalam air telah dipertahankan dalam proses evolusi.

Tabel 1. Hasil perhitungan *conserve column* (\*) pada hasil *multiple alignments*

Protein	Keterangan
HA inang manusia	Rerata 391 (*) dalam 575aa: 34 (*) tiap 50aa
HA inang babi	Rerata 337 (*) dalam 579aa: 29 (*) tiap 50aa
NA inang manusia	Rerata 385 (*) dalam 470aa: 35 (*) tiap 50aa
NA inang babi	Rerata 302 (*) dalam 479aa: 32 (*) tiap 50aa
M2 inang manusia	Rerata 68 (*) dalam 98aa: 35 (*) tiap 50aa
M2 inang babi	Rerata 64 (*) dalam 97aa: 33 (*) tiap 50aa

Berdasarkan data di atas terlihat bahwa perbedaan antara sekuen protein virus H1N1 kurang signifikan karena didapat *conserve column* yang jumlahnya lebih besar dari 5 pada tiap 50 asam amino untuk semua protein (Baxevanis dan Oullette, 2001).

Berdasarkan hasil terdapat *range* skor yang cukup jauh, yaitu antara 78 sampai dengan 100. Data tersebut sangat dimungkinkan, sekuen dalam penelitian merupakan perwakilan tahun

1918 sampai dengan 2009 berasal dari lima benua di dunia, yaitu Afrika, Asia, Eropa, Australia, dan Amerika. Sekuen protein HA, NA, dan M2 Virus H1N1 inang manusia dan babi digunakan untuk prediksi *epitope* diperoleh berdasarkan skor tertinggi. *Header* Sekuen protein HA, NA, dan M2 dalam format FASTA digunakan sebagai input untuk prediksi *epitope* ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2. *Header* Sekuen Protein HA, NA, dan M2 virus H1N1

Protein	Header Sekuen (Format FASTA)
HA inang manusia	>gi 238695727 gb ACR55004.1  hemagglutinin [Influenza A virus (A/Beijing/3/2009(H1N1))]
HA inang babi	>gi 4585155 gb AAD25301.1 AF091306_1 hemagglutinin precursor [influenza A virus (A/swine/Hokkaido/2/81 (H1N1))]
NA inang manusia	>gi 237689850 gb ACR15757.1  neuraminidase [Influenza A virus (A/Israel/644/2009(H1N1))]
NA inang babi	>gi 190403800 gb ACE77987.1  neuraminidase [Influenza A virus (A/swine/Korea/CAN01/2004(H1N1))]
M2 inang manusia	>gi 229783371 gb ACQ84453.1  matrix protein 2 [Influenza A virus (A/Korea/01/2009(H1N1))]
M2 inang babi	>gi 216409292 dbj BAH02073.1  matrix protein 2 [Influenza A virus (A/swine/Chonburi/NIAH589/2005(H1N1))]

Sekuen protein dipilih dari skor ClustalW2 tertinggi dan memiliki *polybasic amino acid region*, yaitu mengandung 5 Arginin dan 2 Lisin (PQRERRRKKRGLF) sebagai indikator termasuk virus *highly pathogenic* (Nidom, 2005).

#### Prediksi *Epitope* sel T Protein HA, NA, dan M2 Virus H1N1

Beberapa *server* prediksi *epitope proteasomal cleavage* diantaranya PAPROC, MAPPP, dan NetChop (Kesmir *et. al.*, 2002). *Server* NetChop merupakan metode *neural network-based* didasarkan pada ligan MHC kelas I dihasilkan oleh *proteosomal* manusia. Penggunaan *server proteasomal cleavage* mendekati proses *in vivo* direpresentasikan melalui *in silico*. Pemilihan *server* NetChop didasarkan pada prediksi *epitope* lebih akurat dan tampilan *output* data lebih informatif (Saxova, *et. al.*, 2003).

Data output *server* MAPPP berupa barisan-barisan peptida dengan panjang menyamping mengakibatkan pembacaan data kurang efisien. Sedangkan *server* PaProc menghasilkan data output berupa tabel yang berisikan peptida hasil pemotongan oleh *server*.

Prediksi *epitope proteasomal cleavage* juga dapat dilakukan menggunakan program *Bayesian Sequence Learning* merupakan teknik prediksi posisi pemotongan sekuen protein oleh *proteosomal* manusia (Mayo, 2006).

Prediksi *epitope* dalam penelitian dilakukan melalui *server* NetChop 3.0. *Server* NetChop memprediksi *epitope proteasomal cleavage* pada sel T dengan data *input* sekuen asam amino protein HA, NA, dan M2 virus H1N1 inang manusia dan babi dalam format

FASTA. Data Output berupa sekuen protein yang ditandai sisi pemotongannya dengan huruf "S" (*cleavage site*).

Dilanjutkan dengan prediksi skor TAP (*Transporter Antigen Processing*) binding sekuen protein HA, NA, dan M2 dengan menggunakan *server* TapPred.

Analisis dan prediksi TAP binding peptida menggunakan metode *Support Vector Machine* (SVM) (Bhasin dan Raghava, 2003). SVM dikembangkan oleh Boser, *et. al* pertama kali dipresentasikan tahun 1992 dalam *Annual Workshop on Computational Learning Theory*, konsep dasar SVM merupakan kombinasi harmonis dari teori komputasi yang telah ada puluhan tahun sebelumnya (Byun dan Lee, 2003). Berbagai metode dikenal sebelumnya seperti *linear discrimination analysis*, *hidden markov model* (HMM) hingga metode kecerdasan buatan seperti *artificial neural network* (ANN) (Lara, *et. al.*, 2008) prediksi afinitas binding melalui TAP merupakan langkah yang efisien untuk memprediksi *epitope* suatu protein (Peters, *et. al.*, 2003).

*Epitope* MHC kelas I dan II diprediksi melalui *server* SVMHC. Beberapa *server* prediksi *epitope* MHC antara lain MULTIPRED, HLApred, ProPred I, dan ProPred II. *Server* SVMHC digunakan berdasarkan metode SVM (Dönnes dan Elofsson, 2002). *Server* tersebut memprediksi *epitope* MHC kelas I dan kelas II dengan cepat dan memberikan tampilan *output* yang komprehensif (Dönnes dan Elofsson, 2006).

Hasil prediksi *epitope* sel T protein HA, NA, dan M2 virus H1N1 ditampilkan berupa sekuen peptida dengan skor *binding* yang

berbeda-beda Berdasarkan hasil prediksi, dipilih peptida-peptida yang akan digunakan sebagai kandidat *epitope* penyusun pada vaksin, yang didasarkan atas skor *binding* terbesar. Seleksi *epitope* diperoleh dari perbandingan prediksi *proteasomal cleavage*, *TAP binding*, dan MHC kelas I.

Ketika protein virus masuk ke dalam sel target, maka *epitope* pada protein tersebut akan dipecah menjadi fragmen peptida oleh protease, dan kemudian akan berikatan dengan MHC kelas II yang akan membawa *fragmen* peptida tersebut ke permukaan sel agar dapat dikenali oleh *reseptor* pada sel T yang kemudian akan mengaktifkan sistem imunitas sehingga akan menghasilkan respon imunitas. Usaha menghasilkan respon imunitas yang maksimal dengan memprediksi *epitope* MHC kelas II melalui *server SVMHC*.

*Server SVMHC* memprediksi *epitope* dengan panjang sembilan asam amino, analisisnya dilakukan setiap 30 asam amino protein HA, NA, dan M2 virus H1N1 inang manusia dan babi mulai dari asam amino posisi pertama hingga terakhir. Prediksi didasarkan atas kemampuan *epitope* untuk berikatan dengan tiap tipe molekul MHC, direpresentasikan dengan skor *binding* dengan kisaran nilai yang berbeda untuk masing-masing *allele*. Peptida dengan skor lebih besar dari *cut off (setting treshold)* digolongkan sebagai *binder (High binder, Moderate binder, Low binder)*, sedangkan penelitian hanya memprediksi *High binder* peptida.

### Prediksi *Epitope* Sel B Protein HA, NA, M2 Virus H1N1

Prediksi *epitope* sel B protein HA, NA, dan M2 virus H1N1 menggunakan *server BepiPred* terdapat dalam *homepage Immune Epitope Database Analysis Resource (IEDB-AR)*.

Kemudian prediksi *discontinuous epitope* menggunakan *server DiscoTope* terdapat pula dalam *homepage IEDB-AR*. Hasil prediksi *epitope* sel B protein HA menggunakan *server BepiPred* menghasilkan sekuen peptida dari beberapa *sequential epitope* dan *conformational epitope* dari *server DiscoTope*.

Pada hasil prediksi, ditampilkan posisi-posisi dari *epitope-epitope* tersebut namun prediksi ini tidak disertai dengan skor yang menggambarkan tingkat pengenalan *epitope* oleh sel B atau pengikatan dengan antibodi, sehingga untuk penentuan sekuen vaksin peptida nantinya, *epitope-epitope* hasil prediksi ini diseleksi berdasarkan tingkat *accessible*. Semakin besar tingkat *accessibility*, maka semakin besar pula kemungkinan *epitope* tersebut untuk dapat dikenali oleh sel B atau berikatan dengan molekul antibodi.

### Penentuan Sekuen Vaksin

Vaksin sebaiknya memiliki *epitope-epitope* binding dari sub tipe H1N1 dan influenza tipe A tersebut. Penentuan sekuen vaksin peptida dilakukan melalui kombinasi peptida atas dasar hasil prediksi *epitope* sel B dan sel T. Berdasarkan hasil prediksi *epitope* yang telah dilakukan, terdapat banyak kesamaan antara protein HA inang manusia dengan inang babi begitu pula pada protein NA, dan M2. Sehingga protein yang dijadikan vaksin adalah protein HA, NA, dan M2 berasal dari inang manusia. Ada tiga *epitope* protein yang akan dikombinasi, yaitu *epitope* protein HA, NA, dan M2 dimana *epitope* untuk kombinasi adalah *epitope* sel T (MHC-I dan MHC-II) dan *epitope* sel B memiliki skor paling tinggi (*high-binder*).

Berdasarkan hasil diperoleh *epitope-epitope* protein HA, NA, dan M2 virus H1N1 ditunjukkan pada Tabel 3.

Tabel 3. *Epitope-epitope* protein HA, NA, dan M2 virus H1N1

Sekuen HA:
KNVTVTHSVTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYYWTLVEPGISDTPVHDCNTTCQSIQSRGLFGA IAGFKKVDGFLDIYPKYSEEAKLNREEIDGVKLLNREEIDGVKLGSLQCRICI
Sekuen NA:
LTQGALLNDFFLTQGALLNDKHSNSLCPVSGWASPYNSRFESGISGPDNGATDGPSNGQAYICSGIFG DFGDNPRPNDKTGSCGPVSSNGANGVFSFKYGNV

Sekuen M2:

RCSDSSDP IIGILHLILITDRLFFKRRFKYGLKRDRLFFKCIYRRDDGHFVNIE

Bagian sekuen berwarna merah adalah *epitope* MHC-I, sedangkan hijau merupakan *epitope* MHC-II. Bagian sekuen berwarna biru adalah *epitope* sel B.

Berdasarkan hasil penentuan *epitope* tersebut, dibuat enam rancangan vaksin,

dengan rincian dua vaksin berdasarkan pada *template* HA untuk vaksin MHN dan NHM; dua vaksin berdasarkan pada *template* NA untuk vaksin HNM dan MNH dan dua vaksin berdasarkan pada *template* M2 untuk vaksin HMN dan NMH. Sekuen vaksin ditunjukkan pada Tabel 4.

Tabel 4. Sekuen vaksin

&gt;Vaksin\_HNM

KNVTVTSHSVTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYYWTLVEPGISDTPVHDCNTTCQSIQSR  
GLFGAIAGFKKVDGFLDIYPKYSEEAKLNREEIDGVKLLNREEIDGVKLGSLQCRICILTQGA  
LLNDFFLTQGALLNDKHSNSLCPVSGWASPYNRSFESGISGPDNGATDGPSNGQAYICSGIFG  
DFGDNPRPNDKTGSCGPVSSNGANGVFSFKYGNVCSDDSDPIIGILHLILITDRLFFKRRFK  
YGLKRDRLFFKCIYRRDDGHFVNIE

&gt;Vaksin\_MNH

RCSDSSDP IIGILHLILITDRLFFKRRFKYGLKRDRLFFKCIYRRDDGHFVNIELTQGALLNDF  
LTQGALLNDKHSNSLCPVSGWASPYNRSFESGISGPDNGATDGPSNGQAYICSGIFGDFGDN  
RPNDKTGSCGPVSSNGANGVFSFKYGNVKNVTVTSHSVTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGA  
KSFYYWTLVEPGISDTPVHDCNTTCQSIQSRGLFGAIAGFKKVDGFLDIYPKYSEEAKLNRE  
EIDGVKLLNREEIDGVKLGSLQCRICI

&gt;Vaksin\_HMN

KNVTVTSHSVTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYYWTLVEPGISDTPVHDCNTTCQSIQSR  
GLFGAIAGFKKVDGFLDIYPKYSEEAKLNREEIDGVKLLNREEIDGVKLGSLQCRICIRCS  
SDPIIGILHLILITDRLFFKRRFKYGLKRDRLFFKCIYRRDDGHFVNIELTQGALLNDFFLTQ  
GALLNDKHSNSLCPVSGWASPYNRSFESGISGPDNGATDGPSNGQAYICSGIFGDFGDNPR  
NDKTGSCGPVSSNGANGVFSFKYGNV

&gt;Vaksin\_NMH

LTQGALLNDFFLTQGALLNDKHSNSLCPVSGWASPYNRSFESGISGPDNGATDGPSNGQAYI  
CSGIFGDFGDNPRPNDKTGSCGPVSSNGANGVFSFKYGNVRCSDSDPIIGILHLILITDRLFF  
KRRFKYGLKRDRLFFKCIYRRDDGHFVNIEKNVTVTSHSVTSSWPNHDSNKGVTAACPHAG  
AKSFYYWTLVEPGISDTPVHDCNTTCQSIQSRGLFGAIAGFKKVDGFLDIYPKYSEEAKLN  
REEIDGVKLLNREEIDGVKLGSLQCRICI

&gt;Vaksin\_NHM

LTQGALLNDFFLTQGALLNDKHSNSLCPVSGWASPYNRSFESGISGPDNGATDGPSNGQAYI  
CSGIFGDFGDNPRPNDKTGSCGPVSSNGANGVFSFKYGNVKNVTVTSHSVTSSWPNHDSN  
KVTAACPHAGAKSFYYWTLVEPGISDTPVHDCNTTCQSIQSRGLFGAIAGFKKVDGFLDIY  
PKYSEEAKLNREEIDGVKLLNREEIDGVKLGSLQCRICIRCSDDSDPIIGILHLILITDRLFFKRR  
KYGLKRDRLFFKCIYRRDDGHFVNIE



&gt;Vaksin\_MHN

```

RCS DSSDPIIGILHLILITDRLFFKCRRFKYGLKRDRDLFFKCIYRRDDGHFVNIEKNVTVTHSVT
SSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYYWTLVEPGISDTPVHDCNTTCQSIQSRGLFGAIAAGFK
KVDDGFLDIYPKYSEEAKLNREEIDGVKLLNREEIDGVKLGSLQCRICILTQGALLNDFFLTQG
ALLNDKHSNSLCPVSGWASPYNSRFESGISGPDNGATDGPNSNGQAYICSGIFGDFGDNPRPND
KTGSCGPVSSNGANGVFSFKYGNV

```

Vaksin MHN didapatkan melalui kombinasi urutan peptida *epitope* protein M2, HA, dan NA, sedangkan vaksin NHM merupakan kombinasi urutan peptida *epitope* protein NA, HA, dan M2. Vaksin HNM kombinasi urutan peptida *epitope* protein HA, NA, dan M2, sedangkan vaksin MNH kombinasi urutan peptida *epitope* protein M2, NA dan HA. Vaksin HMN kombinasi urutan peptida *epitope* protein HA, M2, dan NA, sedangkan vaksin NMH kombinasi urutan peptida *epitope* protein NA, M2, dan HA. Keenam sekuen vaksin peptida ditunjukkan dalam format FASTA.

### Homology Modeling

Pendekatan *Homology modeling* dilakukan dalam penelitian untuk memprediksi struktur tersier dari vaksin. Prediksi struktur tersier suatu protein dengan *homology modelling* dapat dilakukan dengan syarat apabila kesamaan sekuen antara protein tersebut dengan protein database paling sedikit 20% (Bourne, 2003). Hasil sekuens *homology modelling* sekuen protein virus H1N1 dengan protein pada database menunjukkan lebih besar dari 50%, maka dapat dilakukan prediksi struktur vaksin dengan metode *homology modelling*.

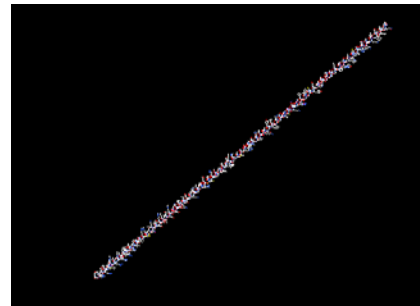
### Pencarian Template

Pencarian *template* dilakukan melalui server CPHModels terkoneksi dengan PDB *source* akses internet. Pencarian *template* dilakukan apabila data PDB sekuen protein target tidak ada dalam *database*. Pemilihan *template* untuk protein HA adalah kode PDB 1RUZ (*chain H*); protein NA adalah 2HTY (*chain A*); dan protein M2 adalah 2KIH (*chain A*). Kemudian masing-masing *template* diunduh dalam format PDB.

### Modeling Struktur Tersier Vaksin

Struktur vaksin dalam DeepView dikonversi sebagai rantai lurus struktur primer

(Gambar 2). Konversi ke bentuk rantai lurus memudahkan struktur vaksin mengikuti struktur *templat*nya.



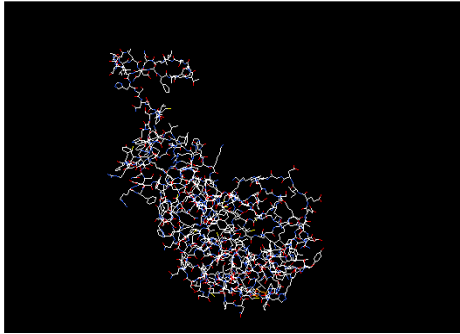
Gambar 2. Tampilan struktur vaksin NHM (Program DeepView)

Setelah *template* diunduh, struktur tersier *template* tersebut kemudian divisualisasikan menggunakan DeepView dengan cara membuka data PDB dari *template*. Hasil dari visualisasi didapatkan struktur tersier *template* dalam bentuk 3D dan dapat diputar sesuai sumbu putar. Residu-residu penyusun dapat dilihat melalui menu *Control Panel*.

Pelekatan struktur vaksin kepada *template* bertujuan agar struktur rantai lurus vaksin dapat berubah menjadi struktur tersier. Residu-residu yang sama akan saling melekat sehingga struktur vaksin akan ikut melipat dan akan merubah struktur rantai lurus menjadi struktur tersier. Melekatkan struktur vaksin pada *template* dapat dilakukan menggunakan program DeepView dengan memilih menu *Magic Fit* setelah membuka *file PDB template*.

### Struktur Tersier Vaksin

Visualisasi struktur tersier vaksin hasil pelekatan dilakukan dengan memindahkan struktur tersier *template*, sehingga terlihat struktur tersier vaksin (Gambar 3).

Gambar 3. Tampilan struktur tersier vaksin NHM (Program *DeepView*)

Tabel 5. Kesamaan Protein Vaksin dengan data PDB

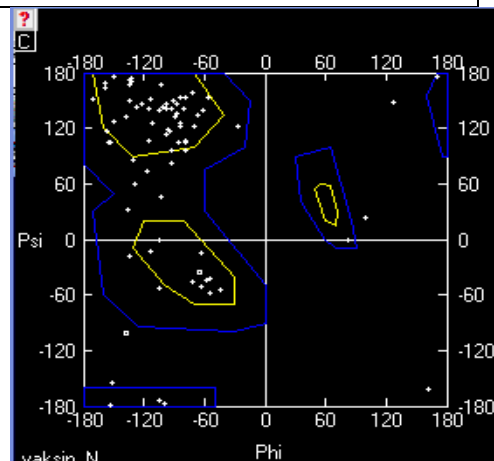
Vaksin	Data PDB	Sekuen <i>Homolog</i> (posisi)
NHM	1RUZ	TSSWPNH (113-119)
MHN	(molecule: Hemagglutinin) (chain: H)	KGVTAACSYAGASSTY (123-138)
HNH	2HTY	YICSGIFGD (181-189)
MNH	(molecule: Neuramidase) (chain: A )	NRPNDKTGSCGPVSSNGANGV (198-219) FSFKYGNV (216-224)
HMN	2KIH (molecule: Matrik 2) (chain: A)	IIGILHL (130-136)
NMH		ITDRLFFKC (139-147) RRFKYGLK (148-156)

Tabel 5 menunjukkan bahwa keenam rancangan vaksin memiliki kesamaan sekuen dengan protein virus influenza A H1N1, diharapkan memiliki fungsi yang sama dan memicu respon imunitas seperti pada protein virus.

Perbaikan struktur tersier vaksin perlu dilakukan untuk memperbaiki residu-residu yang saling tumpang tindih. Protein yang memiliki struktur asam amino sama dengan *template* belum tentu lipatan (*folding*) protein dalam bentuk tersiernya juga sama dikarenakan pengaruh interaksi antar asam amino dengan asam amino samping atau asam amino tetangga.

### Evaluasi Struktur Tersier Vaksin

Evaluasi struktur tersier vaksin dilakukan dengan melihat residu yang saling tumpang tindih dan dengan cara menganalisis *Ramachandran Plot* dari struktur vaksin melalui menu *Ramachandran Plot* yang terintegrasi pada *DeepView* (Gambar 4).

Gambar 4. Ramachandran Plot dari struktur tersier vaksin NHM (Program *DeepView*)

Kombinasi tertentu dari  $\phi$  (*phi*) dan  $\psi$  (*psi*) tidak diperbolehkan karena akan menghasilkan *steric hindrance* atau tumpang tindih antara atom-atom dalam protein. *Ramachandran plot* digunakan untuk mengecek dan mengatur kembali konformasi idak realistik suatu model protein. *Ramachandran plot* memiliki suatu daerah ditandai oleh garis biru di sekelilingnya,

merupakan daerah koordinat struktur sekunder protein. Daerah tersebut merupakan daerah diperbolehkan (*allowed region*), dimana sebagian besar asam amino diplotkan dalam dalam dua daerah yaitu daerah kuning, yaitu daerah secara sterik membolehkan nilai  $\phi$  ( $\phi$ ) dan  $\psi$  ( $\psi$ ), dan daerah biru, yaitu daerah batasan toleransi maksimal *steric strain*. Sedangkan daerah tidak diperbolehkan (*disallowed region*), yaitu daerah di luar *allowed region*, dimana plot residu selain glisin tidak diperbolehkan ada di daerah tersebut.

Plot glisin dapat berada pada *disallowed region* karena glisin tidak mempunyai rantai samping, sehingga sudut  $\phi$  ( $\phi$ ) dan sudut  $\psi$  ( $\psi$ ) yang dihasilkan pun tak terbatas. Jumlah plot residu selain glisin jika ada pada daerah terlarang menunjukkan kualitas struktur suatu protein. Apabila jumlahnya melebihi 15% dari seluruh jumlah residu protein tersebut, maka kualitas protein itu buruk (Baxevanis dan Ouellette, 2005).

Jumlah residu non glisin yang ada di *disallowed region* pada *Ramachandran Plot* untuk struktur vaksin hasil prediksi *First Approach Mode* maupun *Optimise Mode* jauh lebih kecil dari 15% jumlah keseluruhan residu (258 residu), yaitu berkisar 2 – 2,5%. Dengan demikian maka struktur keenam vaksin yang dihasilkan sudah baik kualitasnya.

### Perbandingan Struktur Tersier Vaksin dengan Database

Pembandingan struktur tersier vaksin dengan data protein dalam bentuk PDB pada *database* dilakukan melalui *FeatureMap3D* pada situs *Center for Biological Sequence Analysis* (CBS) pada alamat situs <http://cbs.dtu.dk/services/FeatureMap3D>.

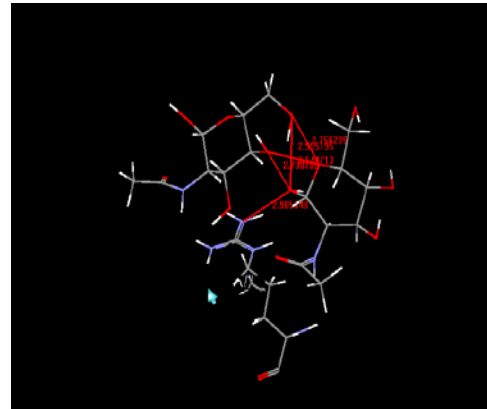
### Validasi Vaksin dengan Database

Validasi sekuen vaksin dengan *database* menggunakan BLASTp terhadap *database* protein *human* dan data PDB virus influenza A. Analisis BLASTp terhadap protein *human* menunjukkan sekuen vaksin tidak ada yang sama dengan protein yang dihasilkan dalam tubuh manusia.

### Molecular Docking

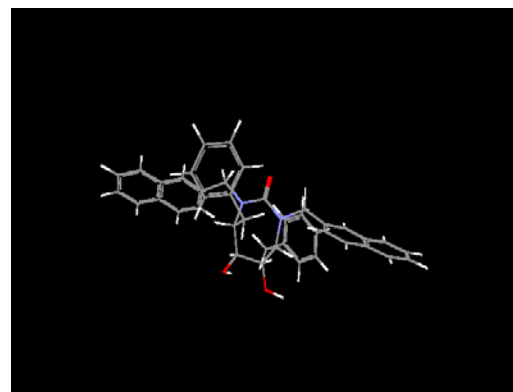
Enam vaksin dalam *file* PDB satu persatu dimasukkan ke dalam program

Arguslab (Gambar 5). Analisis *molecular docking* ligan dan reseptor dalam program Arguslab hanya dapat dilakukan dalam format PDB. Kemudian binding site ligan ditentukan melalui koordinat *file* PDB. Program Arguslab menganalisis *docking* dengan ketelitian tinggi dan fleksibilitas *docking* ligan (Chikhi dan Bensegueni, 2008).



Gambar 5. Struktur ligan dan binding site dari vaksin NHM (Program Arguslab)

Garis berwarna merah menunjukkan ikatan hidrogen antara ligan dengan *binding site* protein. Kemudian dimasukkan file PDB 3GBM yang telah diunduh sebelumnya (Gambar 6).

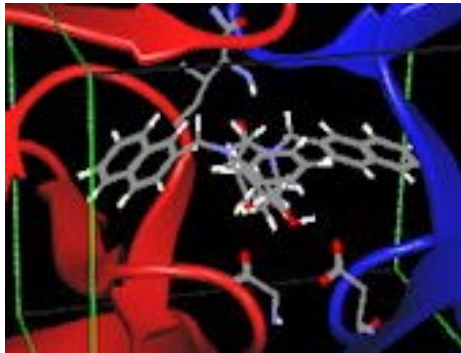


Gambar 6. Struktur antibodi reseptor (Program Arguslab)

Setelah itu dilakukan *calculation docking ligand* dengan mengatur *Binding Site Bounding Box* menjadi 18, 18, 22 Angstroms untuk x,y,z agar visualisasi *docking* menjadi optimal. Hasil akhir visualisasi *docking* ditunjukkan pada Gambar 7 (a) dan (b).



(a)



(b)

Gambar 7. (a) *Docking* antara ligan dengan *reseptor*; (b) Perbesaran gambar *docking* antara ligan dengan *reseptor* (Program Arguslab)

Beberapa informasi yang diperoleh pada hasil akhir antara lain jarak ikatan atom C sebesar 1,9 Amstrong; N sebesar 1,8 Amstrong; O sebesar 1,7 Amstrong, dan S sebesar 2 Amstrong. *Grid docking* sebanyak 208 poin dari total *grid* sebesar 275684 poin. *Clustering* (pengelompokan) sebanyak 14 bentuk konformasi (Tabel 6), waktu yang dibutuhkan untuk optimasi *docking* selama 18 detik dan data energi minimum terbaik interaksi antibodi dengan vaksin sebesar -13,6859 kkal/mol.

Tabel 6. Energi minimum Interaksi 14 bentuk Konformasi hasil *clustering*

Pose	Energi minimum Interaksi (kkal/mol)
1	- 23,69
2	- 12,96
3	- 12,95
4	- 12,94
5	-12,53
6	- 11,49
7	- 11,40
8	- 11,27
9	- 11,18
10	- 11,04
11	- 10,98
12	- 10,75
13	-10,75
14	-10,67

Keberhasilan *docking* hanya ditunjukkan oleh vaksin NHM, sedangkan kelima vaksin lainnya tidak cocok dengan antibodi pada *database* yang bersifat spesifik terhadap antigen tertentu. Daerah pengikatan antibodi dengan antigen (*antigen binding site*)

merupakan *variable region*, artinya daerah tersebut memiliki spesifitas yang berbeda untuk setiap molekul antibodi dan spesifik terhadap suatu antigen

**KESIMPULAN DAN SARAN**

Berdasarkan hasil penelitian prediksi epitope dari *server* NetChop, TAPPred, dan MHCpred (MHC-I dan MHC-II) dan prediksi epitope sel B menggunakan *server* BepiPred dan Discotope diperoleh 21 epitope. 6 rancangan vaksin H1N1 diperoleh berdasarkan penyusunan epitope tersebut, yaitu vaksin HNM, MNH, HMN, NMH, NHM, dan MHN.

Struktur tersier vaksin dari hasil *homology modeling*, menunjukkan kemiripan struktur tersier lebih besar dari 50 % dengan data PDB database. Jumlah residu non glisin yang ada di *disallowed region* pada *Ramachandran Plot* untuk struktur vaksin hasil prediksi *First Approach Mode* maupun *Optimise Mode* kurang dari 15% jumlah keseluruhan residu (258 residu), yaitu berkisar 2 – 2,5%.

Prediksi *molecular docking* berhasil dilakukan pada vaksin NHM dengan jumlah *clustering* (pengelompokan) sebanyak 14 bentuk konformasi, waktu yang dibutuhkan untuk optimasi *docking* selama 18 detik dan data energi minimum terbaik interaksi antibodi dengan vaksin sebesar -13,6859 kkal/mol

Analisis *molecular dynamics* struktur tersier hasil *modeling* dapat dilakukan untuk mengetahui stabilitas dan fleksibilitas rancangan vaksin.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Baxevanis, A. D. and Ouelette, B. F. F. 2005. *Bioinformatics A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins*. 3<sup>rd</sup> ed., Wiley Interscience.
- Bhasin, M., and Raghava, G. P. S. 2003. *Analysis and prediction of affinity of TAP binding peptides using cascade SVM*. *Protein Science*. 13: 596-607.
- Bourne, P. E., and Weissig, H., 2003. *Structural Bioinformatics*, Wiley-Liss, Incorporation, New York. pp 507-521
- Byun, H., and Lee, S.W., 2003. *A Survey on Pattern Recognition Applications of Support Vector Machines*. *J. Int. Pattern Recog. Artific. Intelligence*, 17(3).
- Chikhi, A. And Bensegueni, A. 2008. Docking Efficiency Comparison of Surflex, a Commercial Package and Arguslab, a Licensable Freeware. *Journal of Computation Science System Biology*. Vol. 1. pp 081 – 086.
- Dönnes, P. and Elofsson, A. 2002. *Prediction of MHC class I binding peptides, using SVMHC*. *Biology Medicine Center Bioinformatics. Center for Bioinformatics Saar, Saarland University. Sweden*.
- Dönnes, P. and Elofsson, A. 2006. *SVMHC: a server for prediction of MHC-binding peptides*. *Nucleic Acids Research*, Vol. 34, 194-197
- Kesmir, C., Nussbaum, A. K., Schild, H., Detours, V., and Brunak, S., 2002. *Prediction of Proteasome Cleavage Motifs by Neural Networks*. *Protein engineering*, Vol. 15, No.4, pp 287-296
- Lara, J., Wohlueter, R. M., Dimitrova, Z., and Khudyakov, Y. E. 2008. *Artificial Neural Network for Prediction of Antigenic Activity for A Major Conformational Epitope in the Hepatitis CVirus NS3 Protein*. *Bioinformatics*. Vol. 24 no. 17 2008, pages 1858–1864
- Mayo, M. 2006. *Bayesian Sequence Learning For Predicting Protein Cleavage Points*. Dept. of Computer Science, university of Waikato, New Zealand.
- Nidom, C. A. 2005. *Analisis molekuler genom virus avian influenza H5N1 di Indonesia*. Disertasi. UNAIR.
- Peters, B., Bulik, S., Tampe, R., Endert, P. M. V., and Holzhutter, H. G. 2003. *Identifying MHC Class I Epitopes by Predicting the TAP Transport Efficiency of Epitope Precursor*. *The Journal of Immunology*, 171, 1741-1749
- Raji, M. 2006. *Avian Influenza A (H5N1): Patogenesis, Pencegahan dan Penyebaran pada Manusia*. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. Vol.III, No.2 ,55-65.
- Saxova, P., Buus, S., Brunak, S., and Kesmir, C. 2003. *Predicting proteasomal cleavage sites: a comparison of available methods*. *International Immunology*, Vol. 15, No. 7, pp. 781±787

<http://bioinformatics.coms.edu/mirror/tapped/>  
2008

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> 2009

<http://cbs.dtu.dk/services/NetChop/>

<http://ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/Databases.html> 2008

<http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedbinput> 2008

<http://tools.immuneepitope.org/stools/discotope/discotope.do> 2008

<http://www-bs.informatik.uni-tuebingen.de/SVMHC/> 2008

<http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/>  
2008

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/> 2008

<http://www.who.int/csr/disease/swineflu/en>  
2008