

## HOMOLOGY MODELING EPITOP ISOCITRATE DEHYDROGENASE TIPE 1 (R132H) MENGGUNAKAN MODELLER, I-TASSER DAN (PS)<sup>2</sup> UNTUK VAKSIN GLIOMA

### HOMOLOGY MODELING OF ISOCITRATE DEHYDROGENASE TYPE 1 (R132H) EPITOPES USING MODELLER, I-TASSER AND (PS)<sup>2</sup> FOR GLIOMA VACCINE

Yeni<sup>1</sup>, Daryono Hadi Tjahjono<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium Komputasi, Farmakokimia, Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung, Bandung

Naskah diterima tanggal 21 Februari 2017

#### ABSTRACT

*Glioma is a type of primary malignant brain tumor. The presence of gliomas can be characterized by a mutation R132H of isocitrate dehydrogenase type 1 (IDH1). IDH1 (R132H) contains specific immunogenic epitopes to the tumor. It is appropriate to be used as a glioma vaccine. Therefore, it was necessary to do homology modeling for IDH1 (R132H) epitopes. TMHMM, MEMSAT-SVM and MEMSAT3 were used to predict transmembrane topology of IDH1 (R132H). Analysis of IDH1 (R132H) epitopes was performed using NetMHCII and IEDB<sup>®</sup>. The antigenicity of epitopes were predicted using VaxiJen to obtained 91 epitopes. Homology modeling using Modeller, I-TASSER and (PS)<sup>2</sup> was established for the epitopes that have probability as tumor antigen. The results of homology modeling of IDH1 (R132H) epitopes were validated by MolProbity, ProSA-web and QMEAN. A 3D structure model of the epitopes was selected from three models from the homology modeling based on the validation results. Refinement was established on the Epitope-1 until Epitop-91 using GalaxyRefine and GROMACS for energy minimization.*

**Keywords:** *homology modeling, IDH1 (R132H), vaccine, glioma*

#### ABSTRAK

Glioma merupakan jenis tumor otak ganas primer. Adanya glioma dapat ditandai dengan mutasi R132H pada *Isocitrate dehydrogenase* tipe 1 (IDH1). IDH1 (R132H) yang mengandung epitop imunogenik yang spesifik terhadap tumor dan cocok untuk dijadikan vaksin perlu diketahui strukturnya. Oleh karena itu, perlu dilakukan *homology modeling* epitop IDH1 (R132H). TMHMM, MEMSAT-SVM dan MEMSAT3 digunakan untuk memprediksi topologi transmembran IDH1 (R132H). Analisis epitop-epitop IDH1 (R132H) dilakukan menggunakan NetMHCII dan IEDB. Epitop-epitop hasil analisis diprediksi antigenisitasnya dengan menggunakan VaxiJen sehingga didapatkan 91 epitop. *Homology modeling* epitop-epitop yang memiliki kemungkinan sebagai antigen dilakukan dengan menggunakan Modeller, I-TASSER dan (PS)<sup>2</sup>. Hasil *homology modeling* epitop-epitop IDH1 (R132H) divalidasi dengan MolProbity, ProSA-web dan QMEAN. Kemudian dipilih satu model 3D dari tiga model hasil *homology modeling* untuk setiap epitop dan dilakukan *refinement* pada struktur Epitop-1 sampai Epitop-91 dengan menggunakan GalaxyRefinedan GROMACS untuk meminimasi energi.

**Kata Kunci:** *homology modeling, IDH1 (R132H), vaksin, glioma*

## PENDAHULUAN

Tumor otak meliputi sekitar 85-90% dari seluruh tumor susunan saraf pusat. Berdasarkan data dari GLOBOCAN 2012, Indonesia merupakan negara dengan insidensi tumor otak tertinggi di Asia Tenggara, yaitu 4.903 insidensi dengan angka kematian sebesar 3.402. Tumor otak yang sering terjadi adalah tumor sel glial yang disebut glioma (KPKN, 2015).

*Isocitrate dehydrogenase 1* (IDH1) (R132H) dapat dijadikan penanda adanya glioma (Labussiere dkk., 2010). IDH1 merupakan enzim yang berperan dalam metabolisme tubuh untuk menghasilkan Adenosin trifosfat (ATP) pada siklus asam sitrat. Mutasi pada IDH1 dapat menghasilkan *2-hydroxyglutarat* yang merupakan onkometabolit (Labussiere dkk., 2010; Yang dkk., 2010; Turcan, 2012; Schumacher dkk., 2014). Mutasi somatik pada kodon 132 gen IDH1 yang terletak pada kromosom lokus 2q33 terjadi pada sebagian kecil glioblastoma, tetapi beberapa penelitian melaporkan bahwa mutasi ini terjadi pada sejumlah besar glioma *grade* rendah (Balss dkk., 2008; Bleeker dkk., 2010; Labussiere dkk., 2010; Arita dkk., 2015). Saat ini telah ditemukan 6 mutasi IDH1 yang berbeda dengan frekuensi terbesar pada mutasi R132H dimana terjadi pergantian arginin menjadi histidin, yaitu 89,7% (Arita dkk., 2015).

Dari perspektif imunologi, IDH1 (R132H) merupakan target potensial untuk imunoterapi karena memiliki potensi sebagai neoantigen yang spesifik terhadap tumor. Vaksin protein atau peptida merupakan salah satu tipe vaksin hasil rekayasa. vaksin ini terdiri dari sekuens peptida yang berasal dari bagian kecil protein patogenik. Terdapat beberapa determinan antigenik pada bagian tertentu sekuens peptida vaksin (Tambunan dkk., 2009). IDH1 (R132H) mengandung epitop imunogenik yang cocok untuk vaksinasi (Schumacher dkk., 2014). Epitop vaksin yang didesain secara rasional dapat menghasilkan respon imun yang terkendali (Cherryholmes dkk., 2015). Epitop berhubungan dengan *human leukocyte antigen* (HLA). Setiap individu memiliki rangkaian spesifik HLA kelas I dan kelas II. Epitop yang memiliki afinitas ikatan tinggi terhadap beberapa alel HLA cenderung memiliki potensi sebagai kandidat vaksin (Tambunan dkk., 2016). Epitop IDH1 (R132H) dipresentasikan pada *major histocompatibility complexes* (MHC) kelas II (Schumacher dkk., 2014). Molekul MHC kelas II mempresentasikan peptida antigenik untuk menstimulasi imunitas selular dan humoral melalui aksi limfosit T *helper*. Identifikasi epitop yang terbatas pada MHC kelas II sangat penting untuk desain vaksin berbasis epitop (Zahroh dkk., 2016). Riset medis saat ini umumnya diarahkan untuk menyelidiki vaksin

terapeutik untuk membantu terapi standar (Tambunan dkk., 2007).

*Homology modeling* dilakukan untuk memprediksi struktur tiga dimensi (3D) dari protein yang diharapkan sebanding dengan hasil eksperimen dengan adanya data sekuens protein tersebut. *Homology modeling* merupakan solusi untuk mendapatkan informasi struktur protein apabila terjadi kegagalan dalam eksperimen karena protein yang terlalu besar untuk analisis NMR dan tidak dapat dikristalisasi untuk difraksi sinar X (Krieger dkk., 2003). *Homology modeling* sulit dilakukan apabila keberadaan *template homology* rendah. Desain protein *de novo* memiliki masalah yang sebaliknya. pada desain protein *de novo* telah diketahui suatu struktur *backbone* yang *rigid* atau fleksibel. Tujuan dari desain protein *de novo* adalah menentukan sekuens asam amino yang akan melipat pada struktur tersebut (Khoury dkk., 2014).

## METODE

### Perangkat Keras

ASUS X450J CPU Intel Core i7-4720HQ  
2.6 GHz 64-bit 4GB.

### Perangkat Lunak

Windows 7 Ultimate 2009, Ubuntu 15.10, NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>), Protein Data Bank (<http://rcsb.org/>), TMHMM versi 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), MEMSAT-SVM dan MEMSAT3 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCII/>), IEDB (<http://tools.iedb.org/mhcii/>), VaxiJen versi 2.0 ([www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/](http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/)), Modeller versi 9.15, I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/>), (PS)<sup>2</sup> versi 2.0 (<http://ps2.life.nctu.edu.tw/>), BLASTP<sup>®</sup> (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), Clustal Omega versi 1.2.1 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>), ProSA-web (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>), QMEAN (<http://swissmodel.expasy.org/qmean/cgi/index.cgi>), GROMACS versi 5.0.6, GalaxyRefine (<http://galaxy.seoklab.org/cgi-bin/submit.cgi?type=REFINE>), Chimera versi 1.10.2, dan Discovery Studio versi 16.1.0.15350.

### Bahan

Protein uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah IDH1 *Homo sapiens* yang terdiri dari 414 asam amino dengan penggantian Arginin menjadi Histidin pada urutan asam amino ke-132. Protein IDH1 diunduh dalam format FASTA dari NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>) dengan nomor *accession* CAG38738.1.

## Tahapan Penelitian

### 1. Prediksi Topologi Transmembran

Topologi transmembran protein IDH1 (R132H) diprediksi dengan menggunakan TMHMM versi 2.0 (Krogh dkk., 2001), MEMSAT-SVM dan MEMSAT3 (Krogh dkk., 2001; Nugent dan Jones, 2009). Prediksi ini dilakukan untuk mengetahui apakah protein IDH1 (R132H) merupakan protein transmembran dengan adanya transmembran heliks pada protein.

### 2. Analisis Epitop

Analisis epitop-epitop IDH1 (R132H) dilakukan menggunakan NetMHCII versi 2.2 (Nielsen dkk., 2007; Andreatta dkk., 2011) dan IEDB (Wang dkk., 2008; Wang dkk., 2010) dengan alel HLA-DRB10101.

### 3. Prediksi Antigenisitas

Protein dan epitop-epitop yang memiliki afinitas ikatan yang tinggi dengan MHC II diprediksi antigenisitasnya dengan menggunakan VaxiJen (Doytchinova dan Flower, 2007). Pada VaxiJen, protein dan epitop-epitop dimasukkan dalam format fasta dengan target organisme tumor, batas ambang 0,4 dan *auto cross covariance* (ACC) sebagai *output*. Protein dan epitop dengan batas ambang

### 4. Homology modeling

*Homology modeling* epitop-epitop yang memiliki kemungkinan sebagai antigen dilakukan dengan menggunakan tiga perangkat lunak, yaitu Modeller versi 9.15, I-TASSER dan (PS)<sup>2</sup> versi 2.0 (Chen dkk., 2006; Chen dkk., 2009). Sebelum dilakukan *homology modeling*, terlebih dahulu dilakukan identifikasi *template* dan *alignment* epitop-epitop tersebut dengan protein-protein yang ada dalam *database* PDB dengan menggunakan BLASTP<sup>®</sup>. Dua *template* terbaik dipilih berdasarkan keidentikan sekuens, *query cover* dan *E-value* (Kandasamy dkk., 2014). *Alignment* epitop dengan kedua *template* juga dilakukan dengan menggunakan Clustal Omega versi 1.2.1.

Pada Modeller versi 9.15 digunakan jenis *modeling* dasar dengan 2 *template* hasil dari BLASTP<sup>®</sup>. Kedua *template* tersebut kemudian diseleksi kembali dalam Modeller dan dipilih *template* dengan keidentikan serta resolusi kristalografik yang lebih baik. Setelah itu, dilakukan *alignment* dan *modeling* sehingga dihasilkan 5 model 3D epitop. Model yang dipilih adalah model dengan nilai *discrete optimized protein energy* (DOPE) terkecil (Shen dan Sali, 2006) dan nilai GA341 terbesar (Melo dkk., 2002; John dan Sali, 2003).

Pada *server* I-TASSER dimasukkan sekuens epitop dalam format FASTA dan hasil *alignment* dari Clustal Omega sebagai *template*

acuan dalam pemodelan epitop. Dari hasil *homology modeling* I-TASSER didapatkan 5 model 3D dari epitop dan dipilih 1 model dengan *C-score* terbesar (Zhang, 2008; Roy dkk., 2010; Yang dkk., 2015). Sementara itu, pada *server* (PS)<sup>2</sup> versi 2.0 dimasukkan sekuens epitop dalam format FASTA dan *template* terbaik dari hasil BLASTP<sup>®</sup> yang akan dilakukan *alignment* serta *homology modeling*. Dari hasil (PS)<sup>2</sup> didapatkan 1 model 3D. Model tersebut dapat digunakan apabila memiliki persentase *alignment* 100%.

### 5. Validasi Model

Hasil *homology modeling* epitop-epitop dari Modeller versi 9.15, I-TASSER dan (PS)<sup>2</sup> versi 2.0 divalidasi dengan MolProbity (Chen dkk., 2010), ProSA-web dan QMEAN.

### 6. Refinement

*Refinement* model epitop yang telah divalidasi dilakukan menggunakan GalaxyRefine dan GROMACS versi 5.0.6. Pada GalaxyRefine epitop diunggah dalam format PDB. Kemudian didapatkan 5 model epitop dengan parameter-parameter validasi, yaitu *Global Distance Test High Accuracy* (GDT-HA), RMSD, *MolProbity Score*, *Clash Score*, *Poor Rotamers* dan *Ramachandran Favored*. Dari kelima model tersebut dipilih 1 model terbaik yang memenuhi *goal* dari masing-masing parameter validasi (**Tabel 1**) (Ko dkk., 2012a; Ko dkk., 2012b; Heo dkk., 2013; Lee dkk., 2015). Setelah itu, dilakukan minimisasi energi pada model tersebut dengan menggunakan GROMACS dengan *force field* AMBER99SB-ILDN (Summa dan Levitt, 2006; Lindorff-Larsen dkk., 2010; Abraham dkk., 2015).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### 1. Pengumpulan Data

Protein uji yang digunakan dalam penelitian adalah protein IDH1 *Homo sapiens* yang terdiri dari 414 asam amino dengan penggantian Arginin menjadi Histidin pada urutan asam amino ke-132 sehingga disebut IDH1 (R132H) (**Gambar 1**).

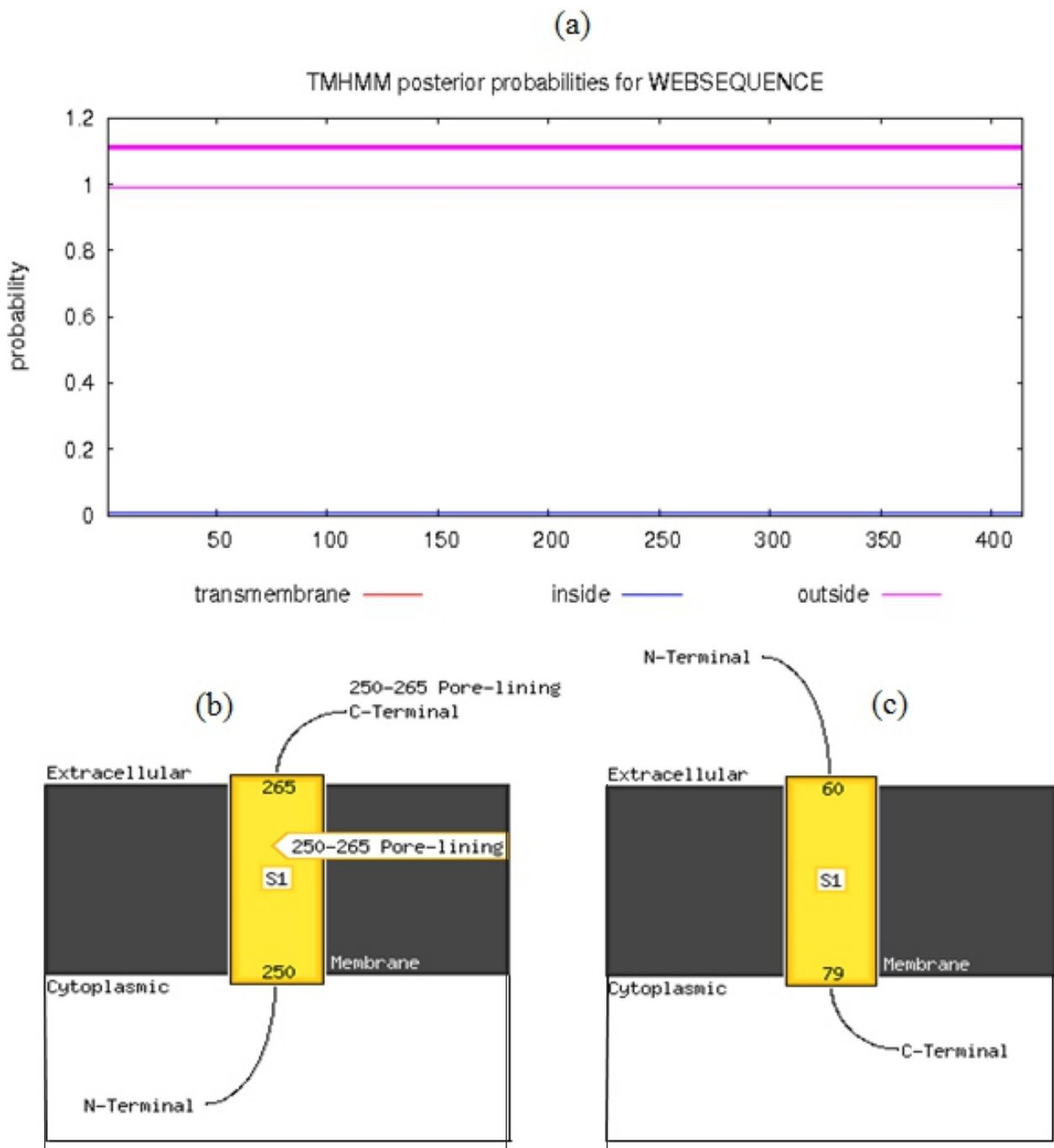
**Tabel 1. Goal parameter-parameter validasi untuk GalaxyRefine (Ko dkk., 2012a; Ko dkk., 2012b; Heo dkk., 2013; Lee dkk., 2015)**

Parameter	Goal
GDT-HA	> 60%
RMSD	= 2 Å
MolProbity Score	< 2 Å
Clash Score	< 0,4 Å
Poor Rotamers	< 0,3%
Ramachandran Favored	> 98%

```

MSKKISGGSVVEMQGDDEMTRIIWELIKEKLIFPYVELDLHSYDLGIENRDATNDQVTKDAAEAIKKH
NVGVKCATITPDEKRVEEFKLKQMWKSPNGTIRNILGGTVFREAIIICKNIPRLVSGWVKPIIIGHAY
GDQYRATDFVVPGPVKVEMTYTPSDGTQKVTYLVHNFEEGGGVAMGMYNQDKSIEDFAHSSSFQ
MALSKGWPLYLSTKNTILKKYDGRFKDIFQEIYDKQYKSQFEAQKIWYEHRLIDDMVAQAMKSEGG
FIWACKNYDGDVQSDSVAQGYGSLGMMTSVLVCPDGKTVEAEAAHGTVTRHYRMYQKGQETST
NPIASIFAWTRGLAHRAKLDNNKELAFFANALEEVSIIETIEAGFMTKDLAACIKGLPNVQRSDYLNTF
EFMDKLGsENLKIKLAQAKL
    
```

**Gambar 1. Urutan 414 asam amino IDH1 (R132H). Histidin yang menggantikan arginin pada urutan asam amino ke-132 ditandai dengan warna merah.**



**Gambar 2. Hasil prediksi topologi transmembran protein IDH1 (R132H). (a) Hasil prediksi TMHMM; (b) Hasil prediksi MEMSAT-SVM; (c) Hasil prediksi MEMSAT3.**

**Tabel 2. Epitop-epitop kandidat vaksin glioma yang memiliki kemungkinan sebagai antigen tumor dari hasil prediksi antigenisitas VaxiJen**

Epitop	Urutan	Epitop	Urutan
1	QYRATDFVVPGPVKV	47	FAHSSFQMALSKGWPLYLST
2	YRATDFVVPGPVKVE	48	AHSSFQMALSKGWPLYLSTK
3	LVHNFEEGGGVAMGM	49	HSSFQMALSKGWPLYLSTKN
4	HNFEEGGGVAMGMYN	50	SSFQMALSKGWPLYLSTKNT
5	SIEDFAHSSFQMAL	51	SFQMALSKGWPLYLSTKNTI
6	SSFQMALSKGWPLYL	52	QMALSKGWPLYLSTKNTILK
7	SFQMALSKGWPLYLS	53	MALSKGWPLYLSTKNTILKK
8	MALSKGWPLYLSTKN	54	LSKGWPLYLSTKNTILKKYD
9	LSKGWPLYLSTKNTI	55	SKGWPLYLSTKNTILKKYDG
10	KGWPLYLSTKNTILK	56	KGWPLYLSTKNTILKKYDGR
11	GWPLYLSTKNTILKK	57	GWPLYLSTKNTILKKYDGRF
12	WPLYLSTKNTILKKY	58	WPLYLSTKNTILKKYDGRFK
13	PLYLSTKNTILKKYD	59	PLYLSTKNTILKKYDGRFKD
14	LYLSTKNTILKKYDG	60	LYLSTKNTILKKYDGRFKDI
15	YLSTKNTILKKYDGR	61	YLSTKNTILKKYDGRFKDIF
16	HLIDDMVAQAMKSE	62	VLVCPDGKTVEAEAAHGTVT
17	RLIDDMVAQAMKSEG	63	LVCPDGKTVEAEAAHGTVTR
18	LIDDMVAQAMKSEGG	64	VCPDGKTVEAEAAHGTVTRH
19	PDGKTVEAEAAHGTV	65	CPDGKTVEAEAAHGTVTRHY
20	DGKTVEAEAAHGTVT	66	PDGKTVEAEAAHGTVTRHYR
21	GKTVEAEAAHGTVTR	67	YQKGQETSTNPIASIFAWTR
22	KTVEAEAAHGTVTRH	68	QKGQETSTNPIASIFAWTRG
23	ASIFAWTRGLAHRAK	69	KGQETSTNPIASIFAWTRGL
24	SIFAWTRGLAHRAKL	70	QETSTNPIASIFAWTRGLAH
25	FAWTRGLAHRAKLDN	71	ETSTNPIASIFAWTRGLAHR
26	LDNNKELAFFANALE	72	TSTNPIASIFAWTRGLAHR
27	DNNKELAFFANALEE	73	STNPIASIFAWTRGLAHR
28	NNKELAFFANALEEV	74	TNPIASIFAWTRGLAHR
29	NKELAFFANALEEVS	75	PIASIFAWTRGLAHR
30	KELAFFANALEEVS	76	IFAWTRGLAHR
31	ELAFFANALEEVSIE	77	FAWTRGLAHR
32	LAFFANALEEVSIE	78	AWTRGLAHR
33	DLAACIKGLPNVQRS	79	WTRGLAHR
34	LAACIKGLPNVQRS	80	RAKLDNNKELAFFANALEE
35	AACIKGLPNVQRS	81	AKLDNNKELAFFANALEEVS
36	ACIKGLPNVQRS	82	KLDNNKELAFFANALEEVS
37	TFEFMDKLGKIK	83	LDNNKELAFFANALEEVS
38	FEFMDKLGKIKL	84	DNNKELAFFANALEEVS
39	KLGENLKIKLAQAKL	85	FMTKDLAACIKGLPNVQRS
40	SKKISGGSVVEMQGD	86	MTKDLAACIKGLPNVQRS
41	KKISGGSVVEMQGD	87	TKDLAACIKGLPNVQRS
42	QKVTYLVHNFEEGGV	88	SDYLNTEFEFMDKLGKIK
43	KVTVLVHNFEEGGV	89	DYLNTEFEFMDKLGKIKL
44	TYLVHNFEEGGV	90	YLNTEFEFMDKLGKIKLA
45	VTVLVHNFEEGGV	91	FEFMDKLGKIKLAQAKL
46	SIEDFAHS SFQMALSKGWPL		

## 2. Prediksi Topologi Transmembran

Prediksi topologi transmembran dari protein IDH1(R132H) melalui TMHMM versi 2.0 menunjukkan bahwa protein ini bukanlah protein transmembran dengan seluruh asam amino berada di luar membran. Namun prediksi topologi dengan menggunakan MEMSAT-SVM dan

MEMSAT3 menyatakan bahwa protein IDH1 (R132H) merupakan protein transmembran dengan 1 domain. Pada hasil MEMSAT-SVM, transmembran heliks protein IDH1 (R132H) dimulai dari asam amino 250 hingga asam amino 265 dengan N terminal berada di dalam sitoplasma dan C terminal di luar sel. Sementara

itu, transmembran heliks protein IDH1 (R132H) dari hasil prediksi MEMSAT3 dimulai dari asam amino 60 hingga asam amino 79 dengan N terminal di luar sel dan C terminal di dalam sitoplasma (**Gambar 2**).

### 3. Analisis Epitop

Pada hasil analisis epitop protein IDH1 (R132H) dengan NetMHCII versi 2.2, didapatkan 54 epitop dari 400 epitop yang terdiri dari 15 asam amino dan 132 epitop dari 395 epitop yang terdiri dari 20 asam amino yang memiliki ikatan kuat dengan MHC II alel HLA-DRB10101. Pada IEDB dihasilkan 400 epitop yang terdiri dari 15 asam amino yang diurutkan berdasarkan %Rank yang terendah. Epitop yang terdiri dari 15 asam amino dipilih dari hasil analisis IEDB dengan %Rank 4,72- 34,80. Epitop-epitop tersebut berjumlah 103 epitop yang mencakup 54 epitop dari hasil analisis NetMHCII. Epitop-epitop yang dipilih dari hasil analisis NetMHCII dan IEDB merupakan epitop yang memiliki afinitas ikatan yang tinggi dengan MHC II alel HLA-DRB10101 karena memiliki nilai *inhibitory concentration 50* ( $IC_{50}$ )  $\leq$  50 nM.

Relevansi khusus untuk desain vaksin adalah mengelompokkan alel-alel HLA sejenis yang menampilkan kapasitas pengikatan peptida yang tumpang tindih. supertipe yang menutupi sebagian besar keberagaman HLA pada populasi manusia dan epitop-epitop antigen yang berikatan dengan supertipe dianggap menjadi kandidat utama untuk formulasi vaksin (Heiny dkk., 2007). Peptida dipresentasikan ke reseptor sel T oleh molekul MHC yang disebut molekul HLA pada manusia. HLA kelas II atau MHC II mengikat dan mempresentasikan peptida ke sel T CD4 yang berperan dalam respon sitotoksik antigen spesifik dan induksi respon memori antigen spesifik (Khan dkk., 2008).

### 4. Prediksi Antigenisitas

Hasil prediksi antigenisitas dari protein IDH1 (R132H) adalah 0,4175. Hal itu menandakan bahwa IDH1 (R132H) memiliki kemungkinan bersifat antigen tumor yang dapat merangsang sistem imun dengan meningkatkan ekspresi MHC. Dari hasil prediksi antigenisitas epitop-epitop didapatkan 91 epitop sebagai kandidat vaksin glioma dengan 39 epitop yang terdiri dari 15 asam amino dan 52 epitop yang terdiri dari 20 asam amino (**Tabel 2**). Epitop-epitop sel T yang berperan dalam respon sitolitik dan regulasi patogen merupakan elemen penting pada vaksin. Seleksi rasional terhadap sekuens antigen protein yang berfungsi sebagai epitop sel T dalam formulasi vaksin sangat penting untuk

keberhasilan strategi vaksin (Khan dkk., 2006).

### 5. Homology modeling

Pada hasil identifikasi dan *alignment* epitop-epitop kandidat vaksin glioma dengan protein-protein yang ada dalam *database* PDB dengan menggunakan BLASTP<sup>®</sup> didapatkan 2 *template* untuk masing-masing epitop. Dua *template* tersebut memiliki persentase *query cover alignment* dengan epitop sebesar 100%, keidentikan 100% dan *E-value* yang terkecil dari semua *alignment* sekuens *database*. *E-value* terkecil untuk *alignment* 91 epitop terhadap *template*-nya berbeda-beda. *E-value* terkecil untuk kedua *template* Epitop-1 adalah  $1 \times 10^{-9}$  sedangkan untuk kedua *template* Epitop-3 adalah  $4 \times 10^{-10}$ . *Multiple alignment* epitop dengan kedua *template*-nya juga dilakukan dengan menggunakan Clustal Omegaversi 1.2.1.

*Homology modeling* untuk 91 epitop dilakukan dengan menggunakan 3 perangkat lunak, yaitu Modeller versi 9.15, I-TASSER dan (PS)<sup>2</sup> versi 2.0. Digunakan 3 perangkat lunak untuk *homology modeling* protein karena adanya perbedaan metode atau pendekatan yang diterapkan.

Modeller mengimplementasikan *modeling* komparatif struktur protein dengan *satisfaction spatial restraints* (Sali dan Blundell, 1993; Fiser dkk., 2000). I-TASSER melakukan pemodelan dengan simulasi *iterative threading assembly* yang diperluas untuk anotasi fungsi berbasis struktur dengan mencocokkan prediksi struktur dengan *template* fungsional yang telah diketahui (Yang dkk., 2015). Metode pemodelan yang digunakan (PS)<sup>2</sup> adalah substitusi matriks baru (S2A2) yang mengkombinasi dua sekuens dan informasi struktur sekunder untuk mendeteksi protein-protein homolog berdasarkan keidentikan dan *alignment target template*. Pada akhirnya struktur 3D protein dibangun dengan menggunakan *package* Modeller (Chen dkk., 2009). Oleh karena itu jika membandingkan struktur 3D epitop hasil *homology modeling* dari ketiga perangkat yang digunakan, maka hasil Modeller mirip dengan hasil (PS)<sup>2</sup>.

Pada hasil *homology modeling* epitop 6, 7, 16, 17, 38, 40, 41, 47, 48, 49, 50, 51, 90 dan 91 tidak ada model 3D (PS)<sup>2</sup> karena dari hasil persentase *alignment* oleh (PS)<sup>2</sup> tidak 100%. Hal itu membuat sekuens asam amino epitop yang tidak ter-*alignment* tidak dibuat bentuk 3D-nya. Persentase *alignment* tersebut terjadi karena pemilihan *template* berdasarkan hasil terbaik BLASTP<sup>®</sup> tidak sesuai dengan *template* yang dipilih otomatis oleh (PS)<sup>2</sup> yang pemilihannya berdasarkan atas konsensus PSI-BLAST dan

**Tabel 3. Hasil homology modeling epitop terbaik dari tiga perangkat lunak Modeller, I-TASSER dan (PS)<sup>2</sup>**

Epitop	Model	Epitop	Model	Epitop	Model	Epitop	Model
1	Modeller	24	I-TASSER	47	Modeller	70	I-TASSER
2	Modeller	25	(PS)2	48	I-TASSER	71	(PS)2
3	Modeller	26	I-TASSER	49	I-TASSER	72	Modeller
4	Modeller	27	I-TASSER	50	Modeller	73	(PS)2
5	Modeller	28	(PS)2	51	Modeller	74	Modeller
6	Modeller	29	I-TASSER	52	I-TASSER	75	I-TASSER
7	Modeller	30	I-TASSER	53	Modeller	76	Modeller
8	Modeller	31	Modeller	54	Modeller	77	Modeller
9	Modeller	32	Modeller	55	Modeller	78	Modeller
10	Modeller	33	(PS)2	56	I-TASSER	79	(PS)2
11	Modeller	34	(PS)2	57	Modeller	80	I-TASSER
12	I-TASSER	35	Modeller	58	(PS)2	81	(PS)2
13	Modeller	36	(PS)2	59	I-TASSER	82	Modeller
14	(PS)2	37	(PS)2	60	(PS)2	83	Modeller
15	I-TASSER	38	Modeller	61	(PS)2	84	(PS)2
16	Modeller	39	Modeller	62	I-TASSER	85	(PS)2
17	Modeller	40	Modeller	63	(PS)2	86	I-TASSER
18	Modeller	41	Modeller	64	Modeller	87	(PS)2
19	Modeller	42	(PS)2	65	Modeller	88	Modeller
20	Modeller	43	(PS)2	66	Modeller	89	Modeller
21	Modeller	44	I-TASSER	67	Modeller	90	I-TASSER
22	Modeller	45	I-TASSER	68	Modeller	91	Modeller
23	Modeller	46	I-TASSER	69	Modeller		

IMPALA (Chen dkk., 2006).

#### 6. Validasi Model

Model 3D epitop hasil *homology modeling* Modeller, I-TASSER dan (PS)<sup>2</sup> divalidasi dengan menggunakan MolProbity, ProSA-web dan QMEAN. Dari hasil validasi dapat dipilih model epitop terbaik untuk masing-masing Epitop-1 hingga 91 (**Tabel 3**).

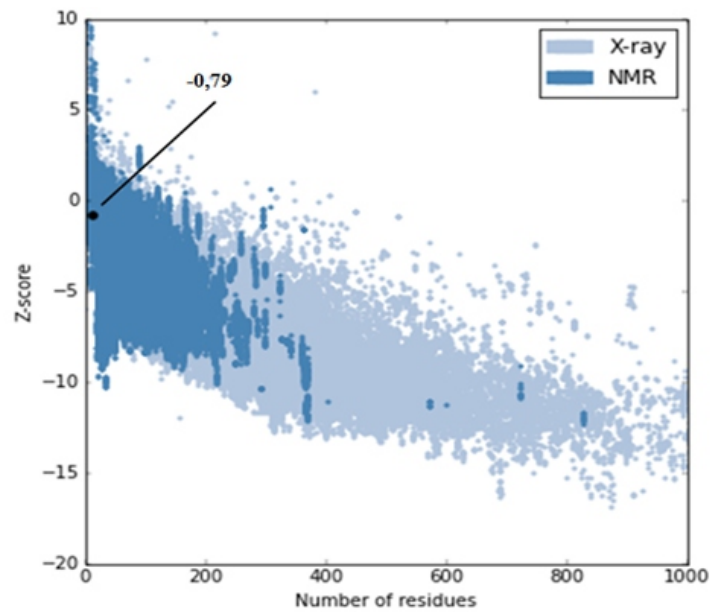
Dalam validasi model epitop, ada beberapa aspek yang perlu dipertimbangkan, yaitu kedudukan residu, interaksi antar residu dan atom yang menyusun residu tersebut (Pitman dan Menz, 2006). Pada MolProbity, validasi interaksi sterik semua atom dalam residu ditunjukkan oleh *Clash Score*. *Clash Score* adalah jumlah benturan per 1000 atom. Semakin kecil *Clash Score*, maka model semakin baik (Davis dkk., 2004). Model 3D epitop diharapkan memiliki *Clash Score* < 0,4 Å.

Analisis geometri juga merupakan indikator yang menentukan baik atau buruk suatu model. *Ramachandran Favored* dan *Poor Rotamer* merupakan parameter yang dapat digunakan untuk analisis geometri model epitop. Model epitop dapat dikatakan baik karena memiliki *Ramachandran Favored* > 98%, *Ramachandran Allowed* > 99,8% dan *Ramachandran Outliers* < 0,2%. *Poor Rotamer* digunakan untuk melihat letak distribusi multidimensi residu. Suatu residu

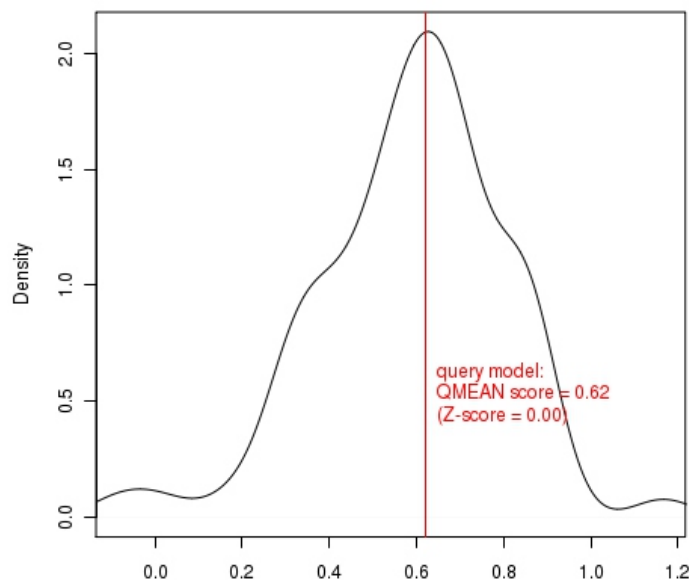
dikatakan *Poor Rotamer* apabila memiliki sudut  $\chi$  rotamer rantai cabang di bawah 1% dari set level nilai  $\chi$ . Model yang baik adalah model yang memiliki *Poor Rotamer* < 0,3%. *MolProbity Score* merupakan nilai kombinasi dari *Clash Score*, *Poor Rotamer* dan *Ramachandran Favored* (Chen dkk., 2009).

ProSA (*Protein Structure Analysis*) digunakan untuk mengevaluasi akurasi model protein. Analisis yang dilakukan berdasarkan analisis statistik dari struktur-struktur protein hasil eksperimen, baik dengan kristalografi sinar-X maupun spektroskopi NMR dalam PDB. Hasil validasi struktur 3D epitop dengan ProSA adalah berupa *Z-score*. Struktur 3D epitop dikatakan akurat apabila memiliki *Z-score* yang masuk ke dalam *range Z-score* struktur protein hasil eksperimen (Wiederstein dan Sippl, 2007). Pada Epitop-1 dihasilkan *Z-score* sebesar -0,79 yang masuk ke dalam *range Z-score* struktur protein hasil eksperimen dengan spektroskopi NMR (**Gambar 3**).

Fungsi skoring QMEAN memperkirakan kualitas global model berdasarkan kombinasi linier dari 6 deskriptor struktural. Empat dari deskriptor tersebut merupakan rata-rata potensial statistik, yaitu geometri lokal yang dianalisis dengan potensial sudut torsi 3 asam amino yang berurutan, 2 potensial interaksi yang bergantung pada jarak berdasarkan atom C<sub>β</sub>



**Gambar 3.** Plot Z-score struktur Epitop-1 hasil *homology modeling* Modeller pada ProSA-web.



**Gambar 4.** Plot densitas QMEAN score Epitop-3 hasil *homology modeling* dengan Modeller dari set referensi.

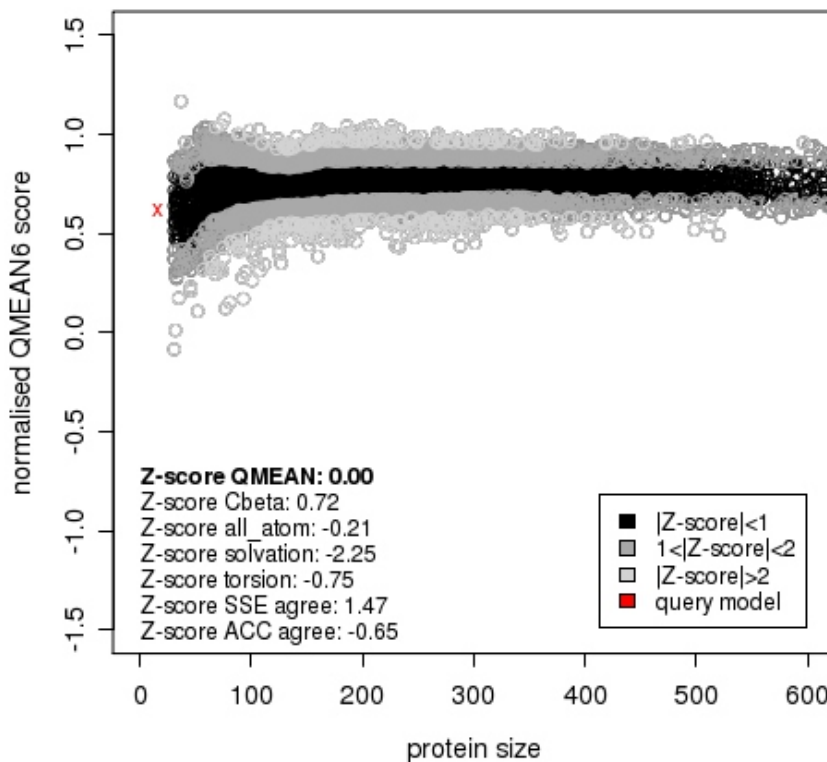
dengan semua atom, dan potensial solvasi. Dua deskriptor lain mencerminkan kesepakatan antara kalkulasi dan prediksi struktur sekunder dan aksesibilitas pelarut. QMEAN Score 0-1 mencerminkan reliabilitas model global yang diprediksi (Benkert dkk., 2009; Benkert dkk., 2011). Pada gambar 4 dapat dilihat plot densitas dari QMEAN Score Epitop-3 hasil *homology modeling* dengan Modeller yang memiliki nilai 0,62. QMEAN Score tersebut menunjukkan bahwa struktur 3D Epitop-3 hasil *homology modeling* dengan Modeller bersifat *reliable*. Dari hasil analisis didapatkan pula Z-score QMEAN

dan Z-score dari 6 deskriptor struktural model epitop yang dibandingkan dengan set *non-redundant* struktur-struktur PDB. Z-score QMEAN Epitop-3 adalah 0,00 yang masuk ke dalam kelompok struktur-struktur PDB dengan Z-score QMEAN kurang dari 1 (**Gambar 5**).

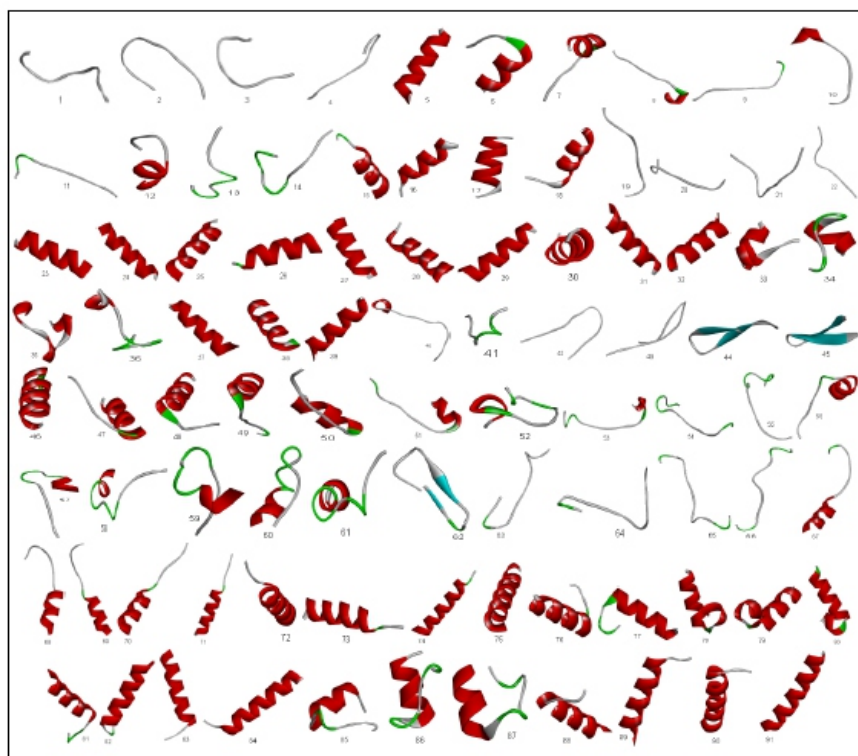
#### 7. Refinement

Pada evaluasi dengan GalaxyRefine, akurasi struktur global dan lokal dirubah. GalaxyRefine awalnya membangun kembali konformasi semua rantai samping dan merelaksasi struktur secara berulang melalui simulasi dinamika molekular pendek, yaitu





**Gambar 5.** Plot *Z-score* QMEAN dan data *Z-score* 6 deskriptor struktural Epitop-3 hasil *homology modeling* dengan Modeller yang dibandingkan dengan set *non-redundant* struktur-struktur PDB. Tanda **x** menunjukkan model Epitop-3.



**Gambar 6.** Model 3D epitop-epitop IDH1 (R132H) hasil minimisasi energi dengan GROMACS yang divisualisasikan dengan Discovery Studio.

selama 0,6 dan 0,8 ps dengan *step* waktu 4 fs setelah perturbasi struktur (Heo dkk., 2013).

Nilai GDT-HA dan RMSD digunakan untuk

pengukuran akurasi struktur global. Sementara *MolProbability Score* digunakan untuk pengukuran akurasi struktur lokal hasil *refinement*. GDT-HA



**Gambar 7. Perbandingan struktur 3D dari epitop 1 (hijau) dengan IDH1 (R132H) (merah muda) yang divisualisasikan dengan Discovery Studio.**

adalah ukuran kualitas global akurasi tinggi dari perbaikan posisi *backbone* multi-superposisi struktur dengan menghitung persentase rata-rata jarak residu dengan atom  $C_{\alpha}$  dari struktur hasil eksperimen dengan *range* 0-1. Semakin tinggi nilai GDT-HA menandakan akurasi yang lebih baik. Berbeda dengan GDT-HA, nilai RMSD yang lebih rendah menandakan akurasi yang lebih baik. Pada pengukuran akurasi struktur lokal, *MolProbity Score* yang lebih rendah menandakan model yang lebih realistis secara fisika (Lee dkk., 2015).

Model yang telah dipilih dari hasil *refinement* GalaxyRefine diminimisasi energinya dengan menggunakan GROMACS versi 5.0.6. Tujuan dari minimisasi energi adalah untuk menghilangkan energi konfigurasi yang terlampaui tinggi karena benturan sterik atau ikatan yang jauh dari keadaan equilibrium yang dapat menyebabkan perturbasi non-fisik dan ketidakstabilan (Pitman dan Menz, 2006). Keadaan energi yang rendah menyebabkan struktur epitop lebih stabil. Model hasil minimisasi energi inilah yang menjadi model akhir (**Gambar 6**). Nilai RMSD dari Epitop-1 dan IDH1 (R132H) adalah 0,086 Å. Hal tersebut menunjukkan bahwa struktur 3D dari hasil *homology modeling* Epitop-1 tidak memiliki perbedaan yang signifikan dengan struktur 3D saat sekuensnya menjadi bagian dari IDH1 (R132H) (**Gambar 7**).

## KESIMPULAN

Pada IDH1 (R132H) terdapat 91 epitop yang bersifat antigen tumor dan memiliki afinitas ikatan yang tinggi dengan MHC II alel HLA-DRB10101 sehingga dapat dijadikan kandidat vaksin glioma. Masing-masing epitop memiliki model 3D terbaik dari hasil *homology modeling* tiga perangkat lunak berbeda, yaitu Modeller, I-TASSER dan (PS)<sup>2</sup>.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abraham, M., Hess, B., Spoel, D., Lindahl, E. 2015. *GROMACS User Manual Version 5.0.6*. The Royal Institute of Technology and Uppsala University. Sweden. Halm 1-196
- Andreatta, M., Schafer-Nielsen, C., Lund, O., Buus, S., Nielsen, M., 2011. NNAAlign: A Web-Based Prediction Method Allowing Non-Expert End-User Discovery of Sequence Motifs in Quantitative Peptide Data. *PLoS ONE*, 61-11
- Arita, H., Narita, Y., Yoshida, A., Hashimoto, N., Yoshimine, T., Ichimura K., 2015. IDH1/2 Mutation Detection in Gliomas. *Brain Tumor Pathol* 32, 79-89
- Balss, J., Meyer, J., Mueller, W., Korshunov, A., Hartmann, C., Deimling, A., 2008. Analysis of The IDH1 Codon 132 Mutation in Brain Tumors. *Acta Neuropathol* 116, 597-602
- Benkert, P., Biasini, M., Schwede, T., 2011. Toward The Estimation of The Absolute Quality of Individual Protein Structure Models. *Original Paper* 27, 343-350
- Benkert, P., Kunzli, M., Schwede, T., 2009. QMEAN Server for Protein Model Quality Estimation. *Nucleic Acids Research* 37, 510-514
- Bleeker, F. E., Atai, N. A., Lamba, S., Jonker, A., Rijkeboer, D., Bosch, K. S. Tigchelaar, W., Troost, D., Vandertop, W. P., Bardelli, A., Noorden C. J. F. V., 2010. The Prognostic IDH1 R132 Mutation is Associated with Reduced NADP<sup>+</sup>-Dependent IDH Activity in Glioblastoma. *Acta Neuropathol* 119, 487-494
- Chen, C., Hwang, J., Yang, J., 2006. (PS)<sup>2</sup>: Protein Structure Prediction Server. *Nucleic Acids Research* 34, 152-157
- Chen, C., Hwang, J., Yang, J., 2009. (PS)<sup>2</sup>-v2: Template-Based Protein Structure Prediction Server. *BMC Bioinformatics* 10, 366-378
- Chen, V. B., W. Arendall, B., Headd, J. J., Keedy D. A., Immormino R. M., Kapral, G. J., Murray L. W., Richardson, J. S., Richardson, D. C., 2010. MolProbity: All-Atom Structure Validation for Macromolecular Crystallography. *Acta Crystallographica* 66, 12-21
- Cherryholmes, G. A., Stanton, S. E., Disis, M. L., 2015. Current Methods of Epitope Identification for Cancer Vaccine Design. *Vaccine*, 1-7
- Davis, I. W., Murray, L. W., Richardson, J. S., Richardson, D. C., 2004. MOLPROBITY: Structure Validation and All-Atom Contact Analysis for Nucleic Acids and Their Complexes. *Nucleic Acids Research* 32, 615-619

- Doytchinova, I. A., Flower, D. R., 2007. VaxiJen: A Server for Prediction of Protective Antigens, Tumour Antigens and Subunit Vaccines. *BMC Bioinformatics* 8, 4-10
- Fiser, A., Do, R. K., Sali, A., 2000. Modeling of Loops in Protein Structures. *Protein Science* 9, 1753-1773
- Fooladi, A. A. I., Hosseini, H. M., Amani, J., 2015. An *In Silico* Chimeric Vaccine Targeting Breast Cancer Containing Inherent Adjuvant. *Iran J Cancer Prevent* 8, 1-8
- Heiny, A. T., Miotto, O., Srinivasan, K. N., Khan, A. M., Zhang, G. L., Brusica, V., Tan, T. W., August, T., 2007. Evolutionarily Conserved Protein Sequences of Influenza A Viruses, Avian and Human, as Vaccine Targets. *PLoS ONE* 2, 1-14
- Heo, L., Par, H., Seok, C., 2013. GalaxyRefine: Protein Structure Refinement Driven by Side-Chain Repacking. *Nucleic Acids Research* 41, 384-388
- John, B., Sali, A., 2003. Comparative Protein Structure Modeling by Iterative Alignment, Model Building and Model Assessment. *Nucleic Acids Research* 31, 3982-3992
- Kandasamy, S., Hassan, S., Gopaldaswamy, R., Narayanan, S., 2014. Homology Modelling, Docking, Pharmacophore and Site Directed mutagenesis Analysis to Identify The Critical Amino Acid Residue of PknI from Mycobacterium Tuberculosis. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 52, 11-19
- Khan, A. M., Miotto, O., Heiny, A.T., Salmon, J., Srinivasan, K.N., dan Eduardo, 2006. A Systematic Bioinformatics Approach for Selection of Epitope Based Vaccine Targets. *Cell Immunol* 244, 141-147
- Khan, A. M., Miotto, O., Nascimento, E. J. M., Srinivasan, K. N., Heiny, A. T., Zhang, G. L., Marques E. T., Tan, T. W., Brusica, V., Salmon, J., dan August, T., 2008. Conservation and Variability of Dengue Virus Proteins: Implications for Vaccine Design. *PLoS Negl Trop Dis* 2, 1-15
- Khoury, G. A., Smadbeck, J., Kieslich, C. A., dan Floudas, C. A., 2014. Protein folding and de novo protein design for biotechnological applications. *Trends in Biotechnology* 32, 99-109
- Ko, J., Park, H., Heo, L., Seok C., 2012a. GalaxyWEB Server for Protein Structure Prediction and Refinement. *Nucleic Acids Research* 40, 294-297
- Ko, J., Park, H., Seok, C., 2012b. GalaxyTBM: Template-Based Modeling by Building A Reliable Core and Refining Unreliable Local Regions. *BMC Bioinformatics* 13, 198-205
- Komite Nasional Penanggulangan Kanker. 2015. *Panduan Nasional Penanganan Tumor Otak*. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta. Halm 1-5
- Krieger, E., Nabuurs, S. B., dan Vriend, G., 2003. Homology modeling. *Wiley-Liss Inc.*, 507-521
- Krogh, A., Larsson, B., Heijne G., Sonhammer, E.L.L., 2001. Predicting Transmembrane Protein Topology with A Hidden Markov Model: Application to Complete Genomes. *J.Mol.Biol* 305, 567-580
- Labussiere, M., Sanson, M., Idbaih, A., Delattre, J. Y., 2010. IDH1 Gene Mutations: A New Paradigm in Glioma, Prognosis and Therapy?. *The Oncologist* 15, 196-199
- Lee, G. R., Heo, L., Seok, C., 2015. Effective Protein Model Structure Refinement by Loop Modeling and Overall Relaxation. *Proteins*, 1-9
- Lindorff-Larsen, K., Piana, S., Palmo, K., Maragakis, P., Klepeis, J. L., Dror, R. O., Shaw, D. E., 2010. Improved Side-Chain Torsion Potentials for The Amber ff99SB Protein Force Field. *Proteins* 78, 1950-1958
- Melo, F., Sanchez, R., Sali, A., 2002. Statistical Potentials for Fold Assessment. *Protein Science* 11, 430-448
- Nielsen, M., Lundegaard, C., Lund, O., 2007. Prediction of MHC Class II Binding Affinity Using SMM-Align, A Novel Stabilization Matrix Alignment Method. *BMC Bioinformatics* 8, 238-249
- Nugent, T., Jones, D. T., 2009. Transmembrane Protein Topology Prediction Using Support Vector Machines. *BMC Bioinformatics* 10, 159-169
- Pitman, M. R. dan Menz R. I., 2006. Methods for protein homology modelling. *Applied Mycology and Biotechnology* 6, 37-59
- Roy, A., Kucukural, A., Zhang, Y., 2010. I-TASSER: A unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols* 5, 725-738
- Sali, A. dan Blundell, T.L., 1993. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *JMB* 234, 779-815
- Schumacher, T., Bunse, L., Pusch, S., Sahm, F., Wiestler, B., Quandt, J., Menn, O., Osswald, M., Oezen, I., Ott, M., Keil, M., Balß, J., Rauschenbach, K., Grabowska, A. K., Vogler, I., Diekmann, J., Trautwein, N., Eichmuller, S. B., Okun, J., Stevanovic, S., Riemer, A. B., Sahin, U., Friese, M. A., Beckhove, P., Deimling, A., Wick, W., dan Platten, M., 2014. Avaccine targeting mutant IDH1 induces antitumour immunity. *Nature*, 1-17
- Schumacher, T., Bunse, L., Wick W., dan Platten, M., 2014. Mutant IDH1: An

- immunotherapeutic target in tumors. *Oncol Immunology* 3, 1-2
- Shen, M. dan Sali, A., 2006. Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. *Protein Sci* 15, 2507-2524
- Summa, C. M. and Levitt, M., 2006. Near-native structure refinement using in vacuo energy minimization. *PNAS* 104, 3177–3182
- Tambunan, U. S. F., Parikesit, A. A., Hendra, Taufik, R. I., Amelia, F., dan Syamsudin, 2009. In Silico Analysis of Envelope Dengue Virus-2 and Envelope Dengue Virus-3 Protein as the Backbone of Dengue Virus Tetravalent Vaccine by Using Homology Modeling Method. *OnLine Journal of Biological Sciences* 9, 6-16
- Tambunan, U. S. F., Parikesit, A. A., Tochary, T. A., dan Sugiono, D., 2007. Computational Study of Post Translation Modification in Chimeric Virus Like Particles Vaccine of Human Papilloma Virus with Virion Capsid L1. *Makara Seri Sains* 11, 56-62
- Tambunan, U. S. F., Sipahutar, F. R. P., Parikesit, A. A., dan Kerami, D., 2016. Vaccine Design for H5N1 Based on B- and T-cell Epitope Predictions. *Bioinformatics and Biology Insights* 10, 27-35
- Turcan, S., Rohle, D., Goenka, A., Walsh, L. A., Fang, F., Yilmaz, E., Campos, C., Fabius, A. W. M., Lu, C., Ward, P. S., Thompson, C. B. Kaufman, A., Guryanova, O., Levine, R., Heguy, A., Viale, A., Morris L. G. T., Huse, J. T., Mellinghoff, I. K., dan Chan, T. A., 2012. IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature* 483, 479-483
- Wang, P., Sidney, J., Dow, C., Mothe, B., Sette, A., dan Peter, S. B., 2008. A systematic assessment of MHC class II peptide binding predictions and evaluation of aconsensus approach. *PLoS Comput Biol* 4, 1-10
- Wang, P., Sidney, J., Kim, Y., Sette, A., Lund, O., dan Nielsen, M., Peters, B., 2010. Peptide binding predictions for HLA DR, DP and DQ molecules. *BMC Bioinformatics* 11, 568-579
- Wiederstein, M. dan Sippl, M. J., 2007. ProSA-web: Interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Research* 35, 407-410
- Yang, B., Zhong, C., Peng, Y., Lai, Z., dan Ding, J., 2010. Molecular mechanisms of “off-on switch” of activities of human IDH1 by tumor-associated mutation R132H. *Cell Research* 20, 1188-1200
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., dan Zhang, Y., 2015. The I-TASSER suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods* 12, 7-18
- Zahroh, H., Ma'rup, A., Tambunan, U. S. F., dan Parikesit, A. A., 2016. Immunoinformatics Approach in Designing Epitope-based Vaccine Against Meningitis-inducing Bacteria (*Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, and *Haemophilus influenzae* Type b). *Drug Target Insights* 10, 19-29
- Zhang, Y., 2008. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* 9, 40-47