
PENAMBATAN MOLEKUL MUTAN TOKSIN DIFTERI TERHADAP SENYAWA NAD⁺ SEBAGAI ALTERNATIF CRM197 PADA VAKSIN KONJUGAT

Umi Baroroh^{1,*}, Hanifa Fauziyah¹, Dewi Astriany¹, Muhammad Yusuf^{2,3}, Mia Tria Novianti³

¹Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia, Jl. Soekarno-Hatta No.354 (Parakan Resik 1), Bandung

²Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran,
Bandung

³Pusat Riset Bioteknologi Molekular dan Bioinformatika, Universitas Padjadjaran, Bandung

*Alamat korespondensi: umibaroroh@stfi.ac.id

Abstrak

Difteri merupakan penyakit pernapasan menular yang menjadi salah satu penyebab utama kematian pada anak-anak. Penggunaan formaldehid pada pembuatan toksoid difteri dinilai merusak sejumlah situs antigenik penting pada toksoid. CRM197 merupakan komponen vaksin yang mengalami mutasi asam amino pada toksin difteri. Adanya efek sitotoksitas CRM197 terhadap sel mamalia dan sel ragi menandakan bahwa mutasi yang terjadi belum menurunkan toksisitas secara optimal, sehingga diperlukan studi lebih lanjut untuk pengembangan mutan toksin difteri baru. Penelitian ini bertujuan untuk memodelkan mutan tersebut dan menguji afinitasnya terhadap ligan NAD⁺. Pendekatan bioinformatika dilakukan dengan penambatan molekul menggunakan program AutoDock 4.2. Diperoleh energi bebas ikatan terendah pada natif sebesar -7,62 kcal/mol. Asam amino Ile31 dan Tyr65 dirancang dengan mensubstitusi menjadi Lys31 dan Gln65 (I31K/Y65Q). Hasil penambatan molekul mutan uji menunjukkan nilai energi ikatan meningkat menjadi -5,91 kcal/mol, menandakan adanya penurunan afinitas NAD⁺. Titik mutasi ini dapat diusulkan untuk pengembangan mutan toksin difteri dengan afinitas rendah terhadap NAD⁺ sebagai kandidat vaksin difteri.

Kata kunci: toksin difteri, CRM197, penambatan molekul, vaksin, bioinformatika

Abstract

Diphtheria is a contagious respiratory disease which is one of the main causes of death in children. The use of formaldehyde in the manufacture of diphtheria toxoid was considered to damage a number of important antigenic sites in toxoids. CRM197 is a component of vaccine from amino acid mutation of G52E in diphtheria toxin. The presence of the cytotoxicity effect of CRM197 on mammalian cells and yeast cells indicates that this mutation carried out have not reduced toxicity optimally, so further studies for development of a new diphtheria toxin mutan are needed. This study aims to model the mutant and test its affinity toward NAD⁺ ligand. Bioinformatics approaches are carried out by molecular docking on AutoDock 4.2. The lowest free energy of binding obtained in the control was -7.62 kcal/mol. Amino acids Ile31 and Tyr65 were designed with substitute to be Lys31 and Gln65 (I31K/Y65Q). The results in molecular docking test showed that the binding energy value increased to -5.91 kcal/mol, indicating a decrease in the affinity of NAD⁺. These mutation points can be proposed in the development of diphtheria toxin with low affinity for NAD⁺ as a candidate for diphtheria vaccine.

Keywords: diphtheria toxin, CRM 197, molecular docking, vaccine, bioinformatics

PENDAHULUAN

Difteri merupakan penyakit pernapasan menular yang menjadi penyebab utama kematian pada anak-anak di seluruh dunia (Hadfield *et al.*, 2000). Penyakit ini telah dikenal sejak masa Hippocrates, yang mendeskripsikan difteri pertama kali pada abad ke-5 SM (CDC, 2015). Infeksi difteri dapat terjadi pada saluran pernapasan ataupun kulit, namun difteri pernapasan adalah jenis difteri yang paling umum ditemui (Kolybo, 2013; WHO, 2018). Pada tahun 2017, terdapat 939 kasus difteri di Indonesia dengan 44 kasus dinyatakan meninggal, dan sebagian besar terjadi pada kelompok usia 1-9 tahun (Hartoyo, 2018).

Difteri disebabkan oleh bakteri spesies *Corynebacterium*, terutama *Corynebacterium diphtheriae* yang menghasilkan racun (WHO, 2018). Pada tahun 1888, Roux dan Yersin mengemukakan bahwa toksin difteri (DT), suatu toksin ekstraseluler yang dihasilkan *C. diphtheriae* ketika berada di dalam tubuh, berperan dalam infeksi (Malito *et al.*, 2012). Toksin yang dilepaskan menyebar melalui darah dan dapat menyebabkan kerusakan berat pada jaringan, terutama di jantung dan saraf hingga menyebabkan kematian (Sariadji & Sunarno, 2017).

Perlindungan imun terhadap difteri sangat penting sebagai upaya pencegahan dari wabah penyakit tersebut (Kolybo, 2013). Hingga saat ini, toksoid difteri masih digunakan sebagai komponen vaksin dalam kegiatan imunisasi difteri. Komponen ini umumnya dikombinasi dengan toksoid tetanus dan vaksin

pertusis, atau dikenal sebagai vaksin DTP (Institute of Medicine, 2012).

Toksoid difteri mulai dikembangkan pada tahun 1920. Toksoid diperoleh dari proses inaktivasi DT menggunakan formaldehida lalu diadsorpsikan ke garam aluminium (CDC, 2015). Namun, penelitian Metz (2005), menemukan bahwa metode ini menyebabkan sebagian besar residu asam amino lisin termetilasi akibat bereaksi dengan formaldehida. Modifikasi lisin tersebut berpengaruh pada rusaknya situs antigenik atau epitop yang penting dalam memicu respon imun protektif, karena terjadi perubahan pada struktur antigen dan konformasi protein.

CRM197 merupakan komponen vaksin yang dilemahkan dengan cara memutasi asam amino glisin ke asam glutamat pada posisi 52 (Malito *et al.*, 2012). Penggantian asam amino tersebut menurunkan toksisitas dan aktivitas enzimatis tanpa menimbulkan perubahan besar pada konformasi protein (Bröker, 2016, Malito *et al.*, 2012). Meskipun diperoleh dari toksin difteri, CRM197 umumnya digunakan pada imunisasi penyakit yang disebabkan bakteri patogen seperti *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, dan *Neisseria meningitidis* (Bröker *et al.*, 2011). Penelitian Kimura (2007) memaparkan adanya sitotoksitas CRM197 terhadap sel ragi dan mamalia, sehingga membatasi penggunaannya sebagai vaksin dalam bentuk DNA maupun RNA. Kimura *et al.*, 2007 merancang toksin difteri dengan melakukan mutasi pada K51 dan E148 (K51E/E148K, CRM197EK) yang

berada pada bagian loop sisi aktif dan telah berhasil diekspresikan.

Pada penelitian ini dilakukan desain struktur mutan toksin difteri secara *in silico* dengan mengganti beberapa asam amino yang terlibat dalam pengikatan terhadap *Nicotinamide Adenine Dinucleotide* (NAD^+) pada toksin. Interaksi intramolekuler tersebut dihilangkan sehingga pengikatan terhadap NAD^+ menurun. Mutan yang diperoleh kemudian dievaluasi interaksinya dengan NAD^+ menggunakan metode penambatan molekul dan dibandingkan dengan natif, CRM197, dan CRM197EK. Desain mutan ini diharapkan memiliki afinitas rendah terhadap NAD^+ , sehingga dapat menjadi kandidat komponen vaksin yang aman dan efektif dalam membentuk imunitas untuk menekan angka kejadian difteri di Indonesia.

METODOLOGI

Alat

Perangkat keras yang digunakan adalah personal computer (PC) dengan spesifikasi processor Intel(R) Core (TM) i5-8250U CPU @ 1.60GHz 1.80 GHz, memory 8 GB RAM, harddisk 320GB, dan GPU NVIDIA GE FORCE 940 MX. Program yang digunakan adalah Autodock 4.2, AutoDockTools-1.5.6, MODELLER, dan BIOVIA Discovery Studio 2017.

Bahan

Sekuen asam amino toksin difteri serta mutan dan struktur protein dengan kode PDB 1SGK (Bell & Eisenberg, 1997).

Penambatan Molekul

Struktur makromolekul 1SGK maupun mutan disiapkan terlebih dahulu pada pH fisiologis (pH 7) menggunakan *server* PDB2PQR (http://nber-222.ucsd.edu/pdb2pqr_2.0.0/), sedangkan ligan NAD^+ ditambahkan muatannya menggunakan BIOVIA Discovery Studio 2017. Struktur makromolekul dan ligan dipreparasi menggunakan program AutoDockTools-1.5.6 dan disimpan dalam format PDBQT. *Grid Parameter File* disiapkan dengan mengatur ukuran *grid box* pada daerah pengikatan ligan NAD^+ , yaitu area yang memiliki sisi aktif CL2 *loop* (residu 38-49) berdasarkan penelitian Malito *et al.*, (2012). I Ukuran *grid box* yang digunakan yaitu 42 x 40 x 40, dengan *spacing* 0,375 Å, dan koordinat *grid point* x-y-z = (25,3; -34,744; 42,28). Selanjutnya, *Dock Parameter File* disiapkan dengan mengatur *run* pada jumlah 100 kali dengan parameter *Lamarckian Genetic Algorithm* (LGA).

Penentuan Asam Amino yang Dimutasi dan Pemodelan Mutan

Berdasarkan analisis interaksi yang terjadi pada natif, ditentukan residu asam amino yang akan diubah. Perubahan asam amino dilakukan melalui pemodelan homologi menggunakan program MODELLER 9.21, dengan memodifikasi kode asam amino pada *file* sekuens toksin difteri. Makromolekul PDB 1SGK digunakan sebagai template. Struktur dimodelkan sebanyak 5 buah dan dievaluasi berdasarkan nilai *Discrete Optimized Protein Energy* (DOPE) terendah. Kualitas model

mutan kemudian dianalisis menggunakan *server* PROCHECK (<https://servicesn.mbi.ucla.edu/PROCHECK/>) sehingga diperoleh data plot Ramachandran.

Evaluasi Hasil Penambatan Molekul

Dilakukan evaluasi meliputi interaksi yang terjadi antara mutan toksin difteri dengan ligan, energi bebas ikatan, perbandingan nilai energinya terhadap mutan pembanding, dan jumlah ikatan hidrogen yang terbentuk. Hasil yang diharapkan adalah energi ikatan yang semakin tinggi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penambatan Molekul Toksin Difteri Natif

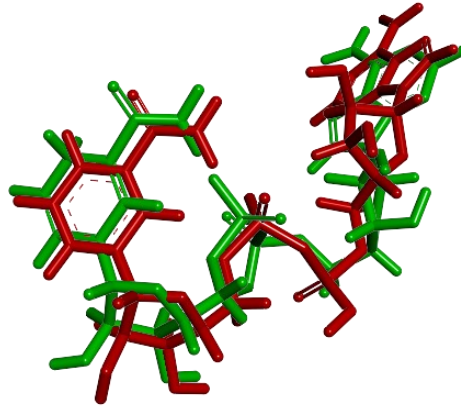
Tahap ini bertujuan untuk memvalidasi metode yang digunakan. Tipe *molecular docking* yang digunakan adalah *flexible ligand docking*, yaitu protein diasumsikan sebagai kaku (*rigid*) sedangkan ligan dianggap fleksibel. Melalui metode ini, akan dihasilkan konformasi ligan yang bervariasi dari hasil penambatan pada sisi aktif makromolekul protein.

File makromolekul protein yang digunakan harus bebas dari molekul air, karena adanya molekul air dapat mempersulit dalam menemukan pose dan menghitung afinitas pengikatan (Wong & Lightstone, 2010). Pengkondisian makromolekul toksin pada pH fisiologis (pH 7) menggunakan *server* PDB2PQR dimaksudkan untuk mengubahnya menjadi bentuk terprotonasi yang sesuai dengan kondisi dalam tubuh (Salmas *et al.*,

2016). Dalam tahap ini, dilakukan pula penambahan hidrogen pada makromolekul.

Ligan dioptimasi dengan menambahkan muatan *gasteiger* dan menentukan jumlah torsi (*rotatable bonds*) yang ingin diaktifkan. Semakin banyak torsi aktif yang dimiliki ligan, maka fleksibilitasnya akan semakin meningkat. Ligan NAD⁺ memiliki torsi sebanyak 17 buah dan diaktifkan.

Daerah pengikatan ligan NAD⁺ pada makromolekul 1SGK ditentukan di area yang memiliki CL2 *loop*, yaitu di sekitar residu 38-49. Pada struktur toksin difteri, CL2 *loop* terletak di dekat situs pengikatan NAD⁺ dan berperan penting sebagai akses bagi NAD⁺ untuk masuk ke sisi pengikatan (Malito *et al.*, 2012). Hasil penambatan molekul didapatkan beberapa konformasi ligan yang diurutkan berdasarkan nilai energi ikatan terendah hingga tertinggi. Pembentukan kompleks protein-ligan yang kuat ditandai dengan nilai energi yang rendah atau lebih negatif (Tambunan & Alamudi, 2010). Berdasarkan data yang didapat, energi ikatan terendah dari 100 konformasi adalah sebesar -7,62 kcal/mol dengan nilai RMSD 1,55 Å (Gambar 1). RMSD merupakan nilai penyimpangan yang digunakan untuk mengetahui penyimpangan hasil *docking* dengan pembandingnya. Nilai RMSD dinyatakan baik jika < 2 Å (Hernandez-Santoyo *et al.*, 2013). RMSD yang semakin besar menunjukkan adanya perbedaan letak posisi pengikatan antara ligan hasil *docking* dengan pembanding (Tambunan & Alamudi, 2010).



Gambar 1. Perbandingan konformasi ligan NAD^+ dengan hasil penambatan molekul. NAD^+ hasil kristalisasi berwarna merah dan hasil penambatan molekul berwarna hijau.

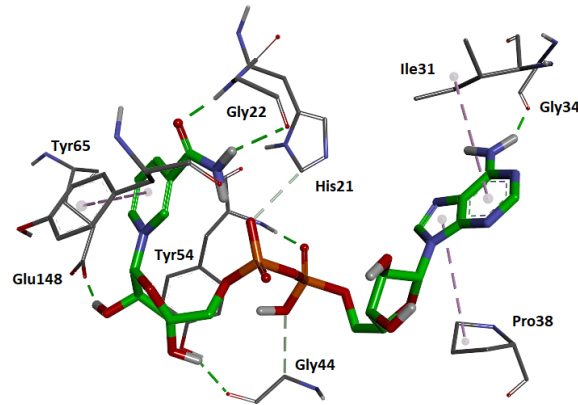
Penentuan Titik Mutasi Asam Amino dan Pemodelan Mutan

Mutasi asam amino yang dilakukan pada penelitian ini bertujuan untuk mengurangi interaksi antara toksin difteri dengan ligan NAD^+ , karena toksisitas dari toksin difteri dipengaruhi oleh dua faktor penting yaitu kemampuan toksin untuk mengikat NAD^+ dan aktivitas ribosilasi ADP di situs katalitik toksin (Uthailak *et al.*, 2017). Menurut Salmas *et al.*, (2016), interaksi NAD^+ pada toksin diperantarai oleh asam amino di sisi pengikatan.

Residu asam amino Tyr54 dan Tyr65 melapisi celah katalitik toksin difteri dan penting dalam pengikatan NAD^+ . Cincin aromatik pada Tyr54 dan Tyr65 membentuk interaksi *stacking* dengan cincin aromatik dari NAD^+ , yang tergolong ke dalam interaksi hidrofobik. Glu148 terlibat dalam pemecahan ikatan N-glikosidik yang melepaskan

nikotinamid dan ADP-ribosa. Residu His21 terlibat dalam menjaga integritas struktural dari situs pengikatan NAD^+ . Selain itu, terdapat pula residu lain yang diketahui terlibat dalam pengikatan NAD baik secara langsung atau tidak langsung, seperti Gly22, Thr23, Gly34, dan Gln36 (Malito *et al.*, 2012).

Berdasarkan visualisasi pada penambatan molekul natif, diketahui bahwa terdapat interaksi dengan sejumlah residu asam amino yaitu His21, Gly22, Ile31, Gly34, Pro38, Gly44, Tyr54, Tyr65, dan Glu148, yang dapat dilihat pada Gambar 2. Menurut penelitian Freitas & Schapira (2017), interaksi hidrofobik termasuk ke dalam interaksi yang paling umum ditemui pada kompleks ligan-protein. Interaksi hidrofobik merupakan kekuatan pendorong utama dalam terjadinya suatu interaksi. Oleh karena itu, mutasi difokuskan pada dua residu asam amino yang menimbulkan interaksi hidrofobik, yaitu Ile31 dan Tyr65.

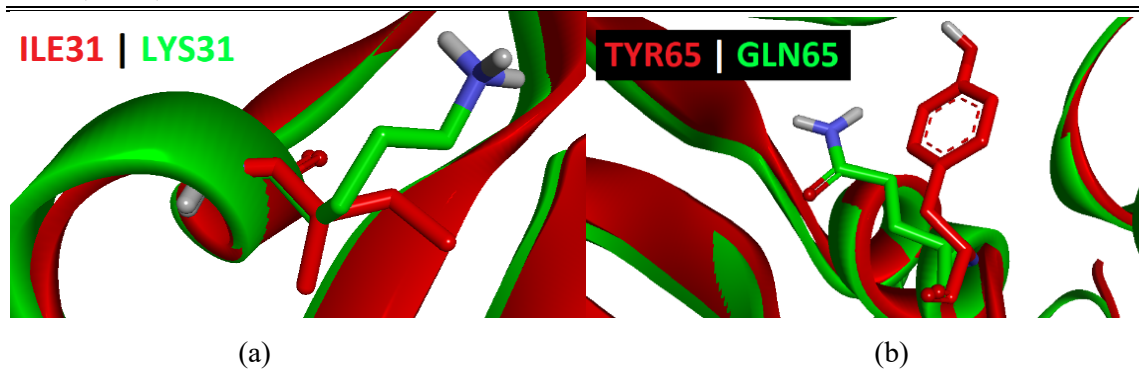


Gambar 2 Interaksi pada natif

Ile31 adalah salah satu residu yang paling sering terlibat dalam interaksi hidrofobik selain leusin, valin, dan alanin (Freitas & Schapira, 2017). Isoleusin bersifat nonpolar dan memiliki rantai samping karbon alifatik (Brandt, 2016). Pada bagian rantai alifatik tersebut terjadi interaksi hidrofobik dengan salah satu cincin aromatik NAD^+ yang mengandung banyak atom nitrogen, karena letaknya yang berhadapan satu sama lain. Untuk mengurangi interaksi pada Ile31, dilakukan mutasi atau penggantian asam amino menjadi lisin (Lys) yang memiliki gugus amina (NH_3) bermuatan positif pada rantai sampingnya. Dengan begitu, rantai alifatik pada lisin pun akan bermuatan parsial positif sehingga mirip dengan suasana cincin aromatik NAD^+ . Selain itu, karena struktur lisin lebih meruah diharapkan ukuran situs pengikatan ligan juga mengecil.

Titik mutasi asam amino yang kedua adalah Tyr65. Tirosin merupakan asam amino

yang memiliki cincin aromatik pada rantai samping. Tirosin dikategorikan sebagai asam amino polar karena terdapat gugus hidroksil pada posisi *para*. Tyr65 membentuk ikatan hidrofobik berupa π -stacking dengan salah satu cincin aromatik pada NAD^+ . Interaksi terjadi secara *face-to-face*, yaitu disebabkan oleh dua cincin aromatik yang saling berhadapan. Menurut Freitas & Schapira (2017), interaksi yang melibatkan cincin aromatik adalah kontributor utama dalam pengenalan protein-ligan. Interaksi π -stacking yang salah satunya cukup sering dipicu oleh residu tirosin dapat meningkatkan afinitas pengikatan. Oleh karena itu, dilakukan perubahan tirosin menjadi residu lain, yaitu glutamin (Gln) yang juga bermuatan polar namun tidak memiliki cincin aromatik untuk mengurangi interaksi π -stacking. Perbedaan struktur antara asam amino sebelum dan sesudah dimutasi dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Perbandingan struktur sebelum mutasi (merah) dan sesudah mutasi (hijau)

Evaluasi Hasil Perancangan Mutan

Untuk mengevaluasi mutan yang dirancang, model struktur CRM197 (Malito *et al.*, 2012) dan CRM197EK (Uthailak *et al.*, 2017) juga dimodelkan. Seluruh model struktur mutan dianalisis kualitasnya menggunakan *server* PROCHECK dan diperoleh data plot Ramachandran. Persentase asam amino di daerah yang diizinkan pada mutan CRM197 adalah sebesar 93,4%, mutan CRM197EK sebesar 95,1% dan mutan uji I31K/Y65Q sebesar 95,7%. Persentase tersebut memenuhi syarat kualitas model protein yang baik, yaitu lebih dari 90% asam amino pada daerah yang diizinkan (Fiser & Šali, 2003).

Penambatan molekul pada natif memiliki energi ikatan sebesar -7,62 kcal/mol dan menunjukkan terdapat 8 ikatan hidrogen yang terbentuk. Sedangkan pada mutan perbandingan yaitu CRM197 dan CRM197EK menghasilkan energi ikatan berturut-turut sebesar -7,57 kcal/mol dan -7,40 kcal/mol. Nilai tersebut tidak berbeda jauh dengan nilai pada natif, menandakan bahwa mutasi yang dilakukan belum dapat menurunkan afinitas NAD⁺ terhadap toksin secara optimal.

Penambatan molekul pada mutan uji menghasilkan total energi ikatan sebesar -5,91 kcal/mol. Nilai tersebut meningkat dari energi ikatan pada natif. Hal ini menunjukkan bahwa afinitas NAD⁺ terhadap mutan uji mengalami penurunan. Dari interaksi ikatan hidrogen, terjadi pengurangan jumlah ikatan hidrogen yang terbentuk. Selain itu, sejumlah ikatan elektrostatik yang semula tidak terdapat pada natif muncul pada interaksi NAD⁺ dengan mutan uji. Namun, energi dari ikatan elektrostatik tersebut tidak begitu berkontribusi dalam memperkuat afinitas, sehingga diperoleh energi bebas ikatan yang lebih rendah apabila dibandingkan dengan CRM197 dan CRM197EK (Tabel 1).

Tujuan memutasi asam amino pada toksin adalah untuk mengurangi pengikatan dengan senyawa NAD⁺, karena toksisitas dari toksin difteri sendiri sangat berkaitan dengan interaksinya terhadap NAD⁺ di dalam sel. Apabila mutan yang dihasilkan masih memiliki afinitas kuat dengan NAD⁺, dikhawatirkan hal tersebut dapat memicu infeksi yang tidak diinginkan. Untuk dapat menjadi suatu kandidat vaksin, hendaknya bentuk toksin yang

telah dilemahkan tidak lagi mampu memicu infeksi, atau dengan kata lain berkurang sifat toksiknya. Hasil ini merupakan prediksi awal

desain mutan melalui nilai afinitas terhadap ligan. Beberapa analisis lanjutan diperlukan untuk mengevaluasi desain ini.

Tabel 1. Interaksi ligan NAD⁺ dengan asam amino pada natif dan mutan

No.	Kompleks	Score	Interaksi dengan Asam Amino		
			Ikatan Hidrogen	Hidrofobik	Elektrostatik
1.	Natif- NAD ⁺	-7,62	His21, Gly22, Gly22, Gly34, Gly44, Gly44, Tyr54, Glu148	Ile31, Pro38, Tyr65	-
2.	CRM197-NAD ⁺	-7,57	Gly22, Gly22, Lys24, Lys24, Lys24, Ser40, Ser40, Thr42, Thr42, Gly44	Tyr54, Tyr65, Tyr65	Lys24, Tyr27
3.	CRM197EK – NAD ⁺	-7,40	His21, His21, Lys24, Gln36, Gly44, Tyr54, Tyr65, Tyr65, Thr42, Gln36	His21, Pro38, Pro38, Tyr54	Tyr27
4.	Mutan Uji (I31K/Y65Q) – NAD ⁺	-5,91	His21, Tyr46, Gly52, Tyr54, Asp61	Lys24, Lys24, Tyr27	Lys24, Lys24, Lys24

SIMPULAN

Untuk mengurangi afinitas NAD⁺ dengan reseptornya beberapa usaha dapat dilakukan. Salah satunya adalah mengubah komposisi asam amino terutama pada bagian situs pengikatan dan juga mempersempit ukuran situs pengikatan. Desain mutan DT pada residu Ile31 menjadi Lys31 dan Tyr65 menjadi Gln65 (I31K/Y65Q) telah berhasil dimodelkan strukturnya. Interaksi mutan I31K/Y65Q dapat mengurangi afinitasnya terhadap NAD⁺, ditandai dengan adanya peningkatan energi

ikatan menjadi -5,91 kcal/mol bila dibandingkan dengan energi ikatan pada natif - 7,62 kcal/mol pada penambatan molekul. Mutasi ini dapat diusulkan untuk dianalisis lebih lanjut dalam pengembangan mutan toksin difteri dengan afinitas rendah terhadap NAD⁺ tanpa merubah konformasi strukturnya.

DAFTAR PUSTAKA

Bell, C. E., & Eisenberg, D. (1997). Crystal structure of nucleotide-free diphtheria toxin. *Biochemistry*, 36(3), 481–488. doi:

- 10.1021/bi962214s
- Bröker, M. (2016). Potential protective immunogenicity of tetanus toxoid, diphtheria toxoid and Cross Reacting Material 197 (CRM197) when used as carrier proteins in glycoconjugates. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 12(3), 664–667. doi: 10.1080/21645515.2015.1086048
- Brandt, Mark. 2016. *Introduction to Protein Structure*. Indiana : Rose-Hulman Institute of Technology
- CDC, C. for D. C. and P. (2015). Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases. The Pink Book: Course Textbook. In *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases*. doi: <https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/index.html>
- Ferreira de Freitas, R., & Schapira, M. 2017. A systematic analysis of atomic protein-ligand interactions in the PDB. *MedChemComm*, 8(10), 1970–1981
- Fiser, A., & Šali, A. (2003). MODELLER: Generation and Refinement of Homology-Based Protein Structure Models. *Methods in Enzymology*, 374, 461–491. doi: 10.1016/S0076-6879(03)74020-8
- Hadfield, T. L., McEvoy, P., Polotsky, Y., Tzinslerling, V. A., Yakovlev, A. A. 2000. The Pathology of Diphtheria. *The Journal of Infectious Diseases*, 181 (1), 116–120
- Hartoyo, E. (2018). Difteri pada Anak. *Sari Pediatri*, 19(5), 301–306.
- Hernandez-Santoyo, A., Yair, A., Altuzar, V., Vivanco-Cid, H., & Mendoza-Barrer, C. 2013. Protein-Protein and Protein-Ligand Docking. *Protein Engineering - Technology and Application*, September 2017
- Institute of Medicine. 2012. *Adverse effects of vaccines: Evidence and causality*. Washington, DC : The National Academies Press
- Kimura, Y., Saito, M., Kimata, Y., & Kohno, K. (2007). Transgenic mice expressing a fully nontoxic diphtheria toxin mutant, not CRM197 mutant, acquire immune tolerance against diphtheria toxin. *Journal of Biochemistry*, 142(1), 105–112. doi: 10.1093/jb/mvm115
- Kolybo, D. V. (2013). Immunobiology of Diphtheria. Recent Approaches for the Prevention, Diagnosis, and Treatment of Disease. *Biotechnologia Acta*, 6(4), 43–62. doi: 10.15407/biotech6.04.043
- Malito, E., Bursulaya, B., Chen, C., Surdo, P. L., Picchianti, M., Balducci, E., ... Spraggon, G. (2012). Structural basis for lack of toxicity of the diphtheria toxin mutant CRM197. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(14), 5229–5234. doi: 10.1073/pnas.1201964109
- Metz, B. (2005). *Structural characterisation of Diphtheria toxoid*.
- Sariadji, K., & Sunarno. (2017). Toksigenitas corynebacterium diphtheriae pada sampel kejadian luar biasa difteri tahun 2010 – 2015 menggunakan elektres. *Jurnal Kesehatan Andalas*, 6(1), 208–212.
- Salmas, R.E., Mestanoglu, M., Unlu, A., Yurtsever, M., & Durdagi, S. 2016. Mutated form (G52E) of inactive diphtheria toxin CRM197: molecular simulations clearly display effect of the

- mutation to NAD binding. *Journal of biomolecular structure & dynamics*, 34(11), 2462-8
- Tambunan, U. S. M., Alamudi, S. 2010. Designing cyclic peptide inhibitor of dengue virus NS3-NS2B protease by using molecular docking approach. *Bioinformatics*, 5(6): 250-254
- Uthailak, N., Mahamad, P., Chittavanich, P., Yanarajana, S., Wijagkanalan, W., Petre, J., & Panbangred, W. 2017. Molecular Cloning, Structural Modeling and the Production of Soluble Triple-Mutated Diphtheria Toxoid (K51E/G52E/E148K) Co-expressed with Molecular Chaperones in Recombinant *Escherichia coli*. *Molecular Biotechnology*, 59(4-5), 117-127.
- Wong, S. E., Lightstone, F. C. 2010. Accounting for water molecules in drug design. *Lawrence Livermore National Laboratory Journal*
- World Health Organization. 2018. *Vaccine Preventable-Diseases : Surveillance Standards – September 2018*. Geneva : World Health Organization