

Prediksi Struktur Tiga Dimensi Protein β -NGF (*Nerve Growth Factor*) Burung Merpati (*Columba livia*)

Nur Alam¹⁾, I Made Budiarsa¹⁾, Dewi Tureni¹⁾

¹⁾Program Studi Pendidikan Biologi, Jurusan Pendidikan MIPA
Universitas Tadulako, Palu, Indonesia
email: budiarsa_imade@yahoo.com

(Article History: Received 16-06-2020; Accepted 04-09-2020; Published 13-09-2020)

ABSTRAK

Protein β -NGF berperan dalam kelangsungan hidup sel neuron dan diferensiasi embrio aves yang diekspresikan oleh gen NGF. Informasi protein β -NGF telah diidentifikasi pada ayam dan masih terbatas dilaporkan pada merpati. Tujuan penelitian adalah memprediksi struktur tiga dimensi protein β -NGF merpati untuk menambah informasi karakter proteinnya. Protein target diperoleh dari server UniProt dengan kode akses B4ZE95. Prediksi struktur tiga dimensi dan karakterisasi protein β -NGF menggunakan server SWISS-MODEL dan program Chimera. Hasil analisis menunjukkan bahwa protein β -NGF merpati dan *template* memiliki nilai *identity* sebesar 89,91%, QMEAN 0,51 serta GMQE sebesar 0,44. Struktur tiga dimensi protein B4ZE95 memiliki asam amino hidrofobik (Ile, Leu, Trp, Phe, Val, Ala, Gly, Met, Cys); karboksil (Glu, Ser, Asp); amina (Lys, Thr) dengan 83 ikatan hidrogen.

Kata kunci: chimera, columba livia, protein β -NGF, swiss-model

Three Dimensional Protein Structure Prediction of β -NGF (Nerve Growth Factor) on Pigeon (*Columba livia*)

ABSTRACT

The β -NGF protein plays a role in the survival of neuron cells and differentiation of avian embryo which is expressed by NGF gene. Information of β -NGF protein was identified in chicken and it is still limited reported in pigeon. The purpose of this study is to predict the three-dimensional structure of pigeon β -NGF protein to add information about its protein character. The target protein is obtained from UniProt server with access code B4ZE95. The prediction of three-dimensional structure and characterization of β -NGF protein were carried out using SWISS-MODEL server and Chimera program. The analysis showed that pigeon β -NGF protein and template had identity of 89,91%, QMEAN 0,51 and GMQE of 0,44. The three-dimensional structure of the B4ZE95 protein has hydrophobic amino acids namely (Ile, Leu, Trp, Phe, Val, Ala, Gly, Met, Cys); carboxyl namely (Glu, Ser, Asp); amine namely (Lys, Thr) with 83 hydrogen bonds.

Keywords: chimera, columba livia, protein β -NGF, swiss model

PENDAHULUAN

NGF merupakan anggota keluarga neurotrophin (Bertaux *et al.*, 2004), yang berperan dalam pertumbuhan dan perkembangan neuron sensoris saraf simpatis (Hallbook *et al.*, 1991). Manca *et al.* (2011), melaporkan bahwa gen NGF mempengaruhi ekspresi terkait dengan regulasi

perkembangan atau proliferasi sel pada tahap awal perkembangan embrio ayam.

Gen NGF terletak di ekson 1 pada manusia, dan di ekson 3 pada tikus (Bertaux *et al.*, 2004). Kimball *et al.* (2009) melaporkan bahwa gen NGF pada ayam terletak di ekson 4 dengan panjang 750 bp. NGF memiliki promotor Arg-Ser-Lys-Arg (RSKR) yang menghasilkan β -NGF peptida (Shaikh *et al.*, 2018), tersusun dari 118 asam

amino secara homodimer dalam ikatan non kovalen (Dawbarn & Allen, 2003).

Protein β -NGF mengikat reseptor TrkA (*tyrosine kinase*) yang menginduksi dimerisasi, autofosforilasi dan aktivasi untuk kelangsungan hidup sel neuron serta diferensiasi (Shaikh et al., 2018) merupakan reseptor yang umum diikat oleh β -NGF (Li et al., 2012), yang membantu dalam pertumbuhan sel neuron (Dawbarn & Allen, 2003).

Informasi β -NGF telah dikaji pada aves disistem saraf pusat yang berperan membantu dalam pemeliharaan dan kelangsungan hidup sel dan terbatas dilaporkan pada merpati, sehingga penting dikaji untuk menambah informasi karakter protein dalam pemetaan struktur tiga dimensi. Zhan & Guo (2015), menjelaskan bahwa struktur tiga dimensi dapat memberikan informasi tentang sifat dan fungsi protein.

Struktur tiga dimensi protein dianalisis secara komputasi sebagai alternatif yang sangat baik dan hemat biaya dalam menganalisis karakteristik protein (Sehar et al., 2013). Prediksi struktur tiga dimensi dilakukan dengan cara pendekatan homologi (Amelia, 2013; Lukitaningsih et al., 2013), yang merupakan pilihan terbaik untuk menentukan struktur tiga dimensi protein dengan pencarian kemiripan *sequence* pada *database* sebagai *template* (Kopp et al., 2007; Amelia & Irayani, 2013).

Penelitian ini bertujuan untuk memprediksi struktur tiga dimensi protein β -NGF merpati dengan pendekatan homologi menggunakan program *SWISS-MODEL* dan diperkuat oleh program *Chimera* untuk mengkarakterisasi hasil prediksi protein β -NGF merpati.

BAHAN DAN METODE

Bahan yang digunakan *sequence* protein β -NGF dari *GenBank* NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) dan alat berupa laptop dengan spesifikasi Intel core i³ berkecepatan 1,00 GHz, RAM 2 GB yang terkoneksi dengan internet. *Server* yang digunakan adalah *Uniprot* (www.uniprot.org), *server Protein Data Bank* (PDB) (www.pdb.org) yang diakses dengan aplikasi *Crome* dalam sistem operasi *windows 8* dan diperoleh protein β -NGF dengan kode akses B4ZE95. Prediksi model

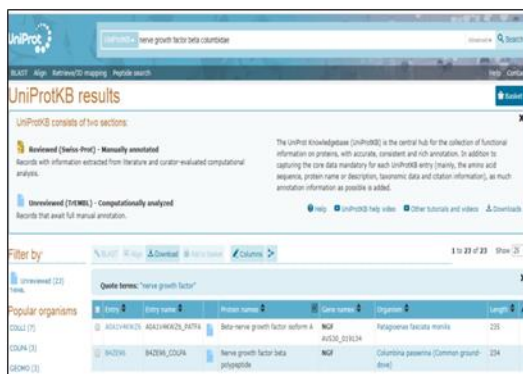
dengan pendekatan homologi pada *server SWISS-MODEL* (swissmodel.expasy.org). Karakterisasi model dilakukan dengan program *Chimera* serta pensejajaran antara *sequence* protein β -NGF dengan *template* pada *BioEdit* yang diakses secara *offline*.

Penentuan *template* menggunakan *workspace user template* pada *SWISS-MODEL* untuk mendapatkan acuan yang cocok dengan *sequence* target. Setelah target didapatkan kemudian membangun model srtuktur tiga dimensi pada *SWISS-MODEL* dan *CHIMERA* untuk mendapatkan informasi protein tentang ikatan hydrogen, residu hidrofobik, dan residu karboksil dan amina. Evaluasi model dilakukan dengan membandingkan nilai *Global Quality Estimation*, *Quality Estimate* dan *Residue Quality* serta Plot Ramachandran.

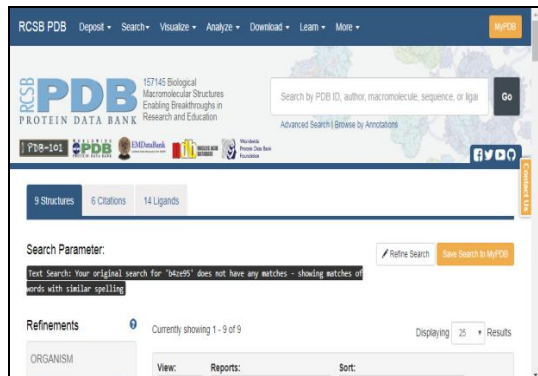
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemilihan Sekuen Target

Target yang diprediksi yaitu protein β -NGF merpati yang diunduh pada *server UnitProt* di [http:// www.uniprot.org](http://www.uniprot.org) sejak tanggal 12 Oktober 2019. Protein β -NGF merpati memiliki kode akses B4ZE95 dengan *identity* 100%, yang tersusun atas 230 asam amino yang di *update* pada tanggal 23 September 2008, kemudian diunduh dalam format *FASTA* (*canonical*). Gambar 1 menunjukkan hasil pencarian protein β -NGF. Struktur protein ini belum ditentukan secara laboratorium, yang dapat dilakukan pengecekan pada *server RCSB PDB* di [http://www.pdb.org /pdb/home.do](http://www.pdb.org/pdb/home.do) yang ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 1. Hasil pencarian protein β -NGF merpati pada *database UnitProt*



Gambar 2. Hasil penelusuran protein β -NGF merpati

Gambar 2 menunjukkan bahwa protein B4ZE95 belum terbangun strukturnya yang ditandai dengan hasil *search parameter* menunjukkan bahwa B4ZE95 tidak memiliki kecocokan.

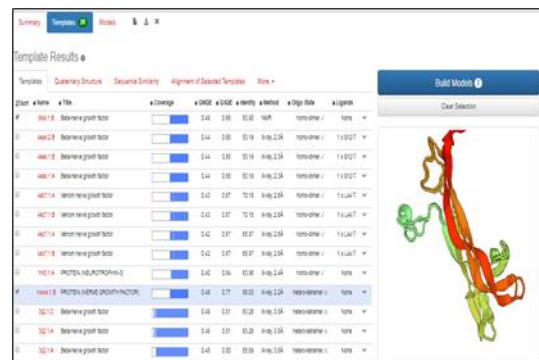
Identifikasi Template

Identifikasi *template* dilakukan pada *SWISS-MODEL workspace* di <https://swissmodel.expasy.org/> dengan pilihan *search template*. Westbrook *et al.* (2003), memaparkan bahwa identifikasi *template* dapat dilakukan pada perpustakaan *template* di *server* SWISS-MODEL ExPDB yang merupakan turunan dari PDB dan memiliki alur kerja otomatis dari *server*. Pemilihan *template* didasarkan pada resolusi, *score* dan *sequence identity* (Lukitaningsih *et al.*, 2013). *Template* yang dipilih 1.www.1.B dengan subunit hetero-tetramer ditentukan dengan *score identity* yang tinggi yakni 88,03% dan X-ray Å. Amelia & Irayani (2012) menjelaskan bahwa *template* yang memiliki tingkat kesamaan lebih dari 50% dapat menghindari kesalahan dalam memprediksi struktur tiga dimensi protein target. Hasil pencarian *template* ditunjukkan pada Gambar 3.

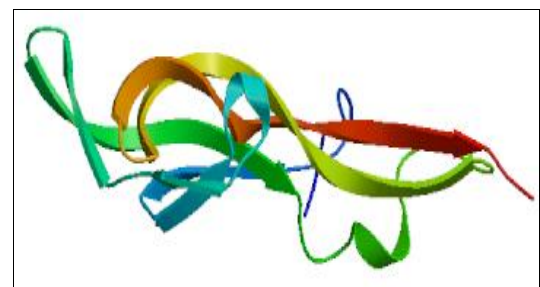
Pemodelan Sekuen Target

Template yang dipilih yaitu subunit monomer dari 1.www.1.B karena *score identity* antara target dengan *template* adalah sebesar 89,91%. Protein B4ZE95 tersusun atas 230 asam amino dengan massa 2313,44 Dalton. Hasil pemodelan protein B4ZE95 memiliki nilai QMEAN -0,51 yang menandakan kualitas model yang baik. Seprianto (2018), melaporkan bahwa nilai QMEAN sekitar 0 adalah baik tetapi -4 atau

dibawahnya adalah buruk. Nilai GMQE sebesar 0,44 yang menandakan kecocokan antara residu struktur target dan *template* mencerminkan ekspektasi akurasi model. Kualitas yang baik dari model perkiraan GMQE berada di antara 0 dan 1 (Rekik *et al.*, 2015). Hasil struktur tiga dimensi protein β -NGF merpati ditunjukkan pada Gambar 4.



Gambar 3. Hasil pencarian *template* pada *server* SWISS MODEL



Gambar 4. Hasil struktur tiga dimensi protein β -NGF merpati

Evaluasi Model

Evaluasi struktur tiga dimensi model dilakukan dengan melihat nilai persentase identitas target dan *template* serta nilai *Global Quality Estimation*. Semakin besar nilai identitas *sequence* dan target maka model semakin mendekati yang sebenarnya. Berdasarkan hasil identifikasi *template* protein β -NGF B4ZE95 memiliki *identity* 89,91 % dengan protein PDB-ID 1.www.1B. Tabel 1. menunjukkan parameter penilaian yang digunakan dalam perhitungan *Global Quality Estimation* yang berfungsi memperkirakan kualitas dan ekspektasi akurasi model.

Tabel 1. Parameter Global Quality Estimation antara *template* dan target protein β -NGF merpati

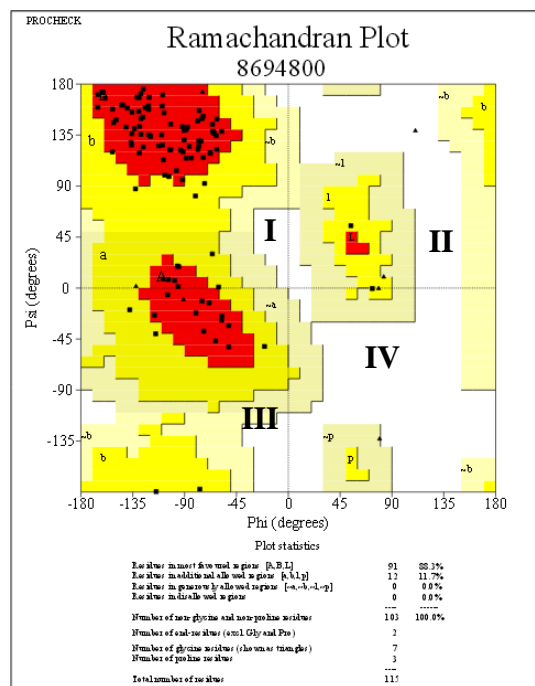
N	Global Quality Estimation	Template	Target
1.	QMEAN	-1,01	-0,51
2.	C β	0,60	0,45
3.	All atom	-0,26	0,10
4.	Solvation	-1,17	-0,69
5.	Torsion	-0,79	-0,40

Nilai QMEAN (*Quality model energy analysis*) menggabungkan beberapa fungsi penilaian untuk memperkirakan kualitas model. Semakin bagus kualitas model ditandai dengan timbulnya tanda ibu jari yang menghadap keatas.

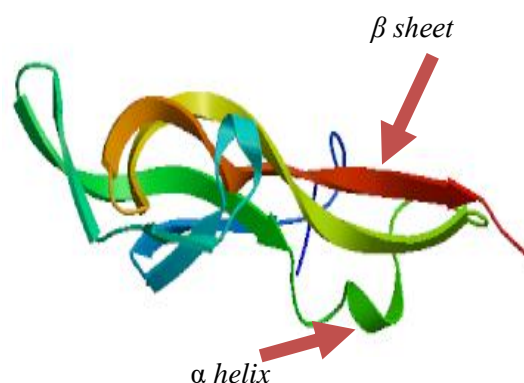
Gambar 5 menunjukkan sebaran asam amino pada Plot Ramachandran. Plot Ramachandran menggambarkan rantai asam amino yang termasuk *alpha helix* dan *beta sheet*. Struktur *alpha helix* memiliki rantai urutan asam amino yang berbentuk *helix*, dan distabilkan dengan ikatan hidrogen dari asam amino. Asam amino penyusun *alpha helix* berada pada daerah *generously allowed regions* dan *additional allowed regions*. Asam amino penyusun *beta sheet* berada pada daerah *most favoured regions* dan *disallowed regions*. Struktur model memiliki rantai *alpha helix* dan lembar *beta sheet* yang dapat dilihat pada Gambar 6.

Plot Ramachandran mempunyai empat kuadran *most favoured regions* (kuadran I), *additional allowed regions* (kuadran II), *generously allowed regions* (kuadran III), dan *disallowed regions* (kuadran IV). Phi (Φ) menyatakan sumbu x, sedangkan psi (Ψ) menyatakan sumbu y dari asam amino suatu struktur protein. Plot Ramachandran adalah indikator untuk mengetahui kualitas intrinsik dari struktur 3D (Petsko dan Ringe, 2004). Kualitas struktur protein yang baik atau buruk tergantung dari sedikit atau banyaknya residu non-glisin yang berada pada daerah *outlier/ disallowed regions*. Kualitas struktur protein dikatakan baik jika residu non-glisin pada daerah *outlier* lebih kecil dari 15% dan semakin kecil akan semakin baik kualitas struktur protein (Lovell et al., 2002). Jumlah residu asam amino pada kuadran I (88,3 %), kuadran II (11,7 %), kuadran III (0,00%), dan kuadran IV (0,00%), ini menandakan bahwa struktur model memiliki kualitas yang

baik karena memiliki residu non glisin pada *disallowed regions* berada dibawah 15% yaitu 0,00%. Bosco & Brasseur (2005), menyatakan bahwa kualitas dan kestabilan model ditandai dengan keberadaan residu asam amino yang berada pada *most favoured regions* lebih besar dari residu asam amino pada *disallowed regions*.



Gambar 5. Hasil visualisasi sekunder protein β -NGF merpati pada plot ramachandran



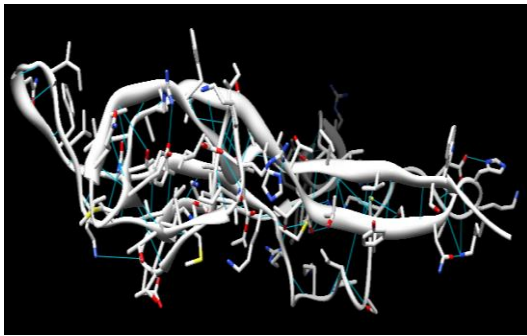
Gambar 6. Rantai *alpha helix* dan lembar *beta sheet* pada struktur tiga dimensi protein β -NGF merpati

Karakteristik protein β -NGF merpati

Ikatan hidrogen terjadi pada atom yang memiliki keelektronegatifan yang tinggi dengan atom hidrogen dan terikat secara kovalen pada suatu atom elektronegatif (Rachmania et al., 2015). Ikatan hidrogen

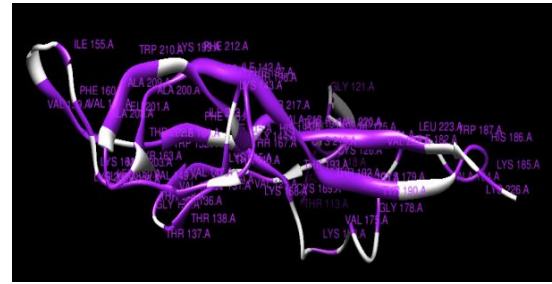
antar residu pada protein B4ZE95 berjumlah 83 ikatan yang menandakan protein β -NGF merpati dalam keadaan stabil. Sheu *et al.* (2009), melaporkan bahwa ikatan hidrogen dapat menstabilkan rangkaian residu asam amino pada struktur tiga dimensi protein dan penentu dalam dinamika serta stabilitas protein. Ikatan hidrogen terjadi antar atom hidrogen pada molekul yang satu dengan salah satu unsur (N, O, F) (Effendy, 2006), dan digambarkan sebagai suatu bentuk interaksi elektrostatis antara atom hidrogen yang terikat pada atom-atom elektronegatif dengan atom elektronegatif lainnya (Pranoto, 2013).

Gambar 7 memaparkan ikatan hidrogen pada protein β -NGF merpati (B4ZE95).

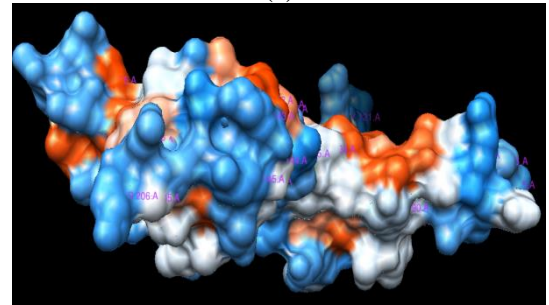


Gambar 7. Hasil tampilan ikatan hidrogen pada protein β -NGF merpati.

Gambar 8 menunjukkan hasil daerah hidrofobik pada B4ZE95. Daerah hidrofobik merupakan asam amino non polar berperan dalam membantu protein dalam melipat. Malau & Sianturi (2019), menjelaskan bahwa residu hidrofobik dapat menaikkan stabilitas protein. Asam amino yang termasuk hidrofobik pada protein B4ZE95 yaitu Ile, Leu, Trp, Phe, Val, Ala, Gly, Met dan Cys. Ala, Val, Leu, dan Ile bersifat hidrofobik karena memiliki rantai samping gugus alkil; Phe dan Trp memiliki rantai samping gugus aromatik; serta Met mengandung gugus sulfur. Gowder *et al.* (2014), melaporkan bahwa residu Val, Leu, Ile, Phe, dan Met merupakan rantai samping kutub yang terkena pelarut untuk menstabilkan tulang punggung polipeptida. Dijelaskan lebih lanjut bahwa kemampuan untuk memprediksi aksesibilitas permukaan residu hidrofobik dari urutan asam amino dapat membantu dalam memilih situs modifikasi kimia atau mutasi tertentu (Chasanah *et al.*, 2005).



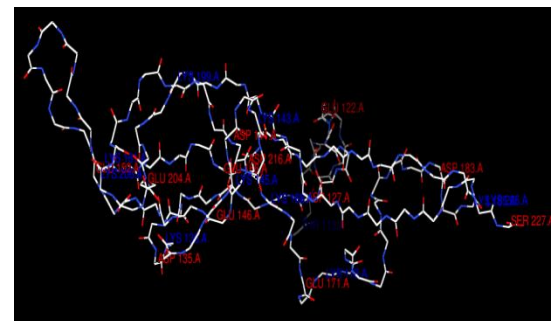
(a)



(b)

Gambar 8. Hasil hidrofobik pada β -NGF merpati (a) visualisasi normal dan (b) *hydrophobicity surface*

Residu karboksil merupakan asam amino bersifat asam dan residu amina adalah asam amino bersifat basa yang dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Daerah karboksil dan amina β -NGF merpati dengan bentuk *backbone*

Daerah karboksil pada target yaitu Glu, Ser, dan Asp. Glu dan Asp termasuk asam amino bersifat asam karena memiliki rantai samping yang mengandung gugus karboksil dan cenderung mengalami deprotonasi pada pH netral dalam air. Daerah amina yaitu Lys dan Thr. Lys merupakan asam amino yang bersifat basa karena bermuatan positif pada pH netral dalam air. Ser dan Thr termasuk asam amino polar tak bermuatan yang bersifat amfoter sehingga cenderung bersifat asam serta basa. Sumarlin *et al.* (2013),

melaporkan bahwa gugus karboksil dan amina merupakan pendukung terbentuknya ikatan hidrogen karena gugus karboksil mengandung karbonil dan hidroksil, interaksi dari kedua gugus ini mengakibatkan suatu kereaktifan yang unik untuk asam karboksilat sehingga gugus karboksil bersifat polar dan reaksinya tidak dipengaruhi sisa molekul.

KESIMPULAN

Protein β -NGF merpati (B4ZE95 ID PDB) dan *template* memiliki *identity* 89,91%, QMEAN 0,51 dan GMQE sebesar 0,44. B4ZE95 tersusun atas asam amino hidrofobik (Ile, Leu, Trp, Phe, Val, Ala, Gly, Met, Cys); karboksil (Glu, Ser, Asp); amina (Lys, Thr) dan 83 ikatan hidrogen.

DAFTAR PUSTAKA

- Amelia, F. 2013. Modeling Struktur Protein Vaksin H5N1 HA BTB menggunakan I-TASSER. *Jurnal Sains dan Teknologi*, **7(1)**: 1-5.
- Amelia, F. & Irayani. 2012. Comparative Modelling Protein Vaksin NA BTB H5N1 menggunakan Swiss Model. *Jurnal Sainstek*, **4(2)**: 165-169.
- Bertaux, O., E. Toselli-Mollereau, Auffray & C.M. Devignes. 2004. Alternative usage of 5 Exons in the Chicken Nerve Growth Factor Gene: Refined Characterization of a Weakly Expressed Gene. *Journal on Gene and Genome*, **3(3)**: 83-97.
- Bosco, K. H. & R. Brasseur 2005. The Ramachandran Plots of Glycine and Pre-proline. *BMC Struc Bio*, **5**: 1-14.
- Chasanah, E., T. S. Maggy & P. Sumpeno. 2005. Penggunaan kolom kromatografi Interaksi hidrofobik untuk pemurnian kitosanase. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*, **11 (8)**: 19-27.
- Dawbarn, D. & S.J. Allen. 2003. Neurotrophins and Neurodegeneration. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, **29**: 211-230.
- Effendy. 2006. *Teori VSEPR Kepolaran, dan Gaya Antarmolekul*. Bayumedia Publishing, Malang.
- Gowder, S.M., J. Chatterjee, T. Chaudhuri & K. Paul. 2014. Prediction and Analysis of Surface Hydrophobic Residues in Tertiary Structure of Proteins. *The Scientific World Journal*. 1-7.
- Hallbook, F., C.F. Ibdiez & H. Persson. 1991. Family Reveal a Novel Member Abundantly Expressed in Xenopus Ovary. *Neuron*, **6**: 845-858.
- Kimball, R.T., E.I. Braun, F.K. Barker, R.C. K. Bowie, M.J. Braun, J.I. Chojnowski, S.J. Hackett, K.L. Hann, J. Harshman, V.H. Torres, W. Holznagel, C.J. Huddleston, B.D. Marks, K.J. Miglia, W.S. Moore, S. Reddy, F.H. Sheldon, J.V. Smith, C.C. Witt & T. Yuri. 2009. A Well-tasted Set of Primer to Amplify Region Spread Across The Avian Genome. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **50**: 654-660.
- Kopp, J., L. Bordoli, J.N.D. Battey, F. Kiefer & T. Schwede. 2007. Assessment of CASP7 Predictions for Template-Based Modeling Targets. *Proteins, 69 Suppl.*, **8**: 38-46.
- Li, B., X. Sheng, M. Song, H. Zhang, J. Weng, M. Zhang, X. Hu, J. Zhou, M. Xu, Q. Wenga, G. Watanabe & K. Taya. 2012. Expression of Nerve Growth Factor and its Receptors TrkA and p75 in the Uterus of Wild Female Ground Squirrel (*Citellus dauricus* Brandt). *General and Comparative Endocrinology*, **176**: 62-69.
- Lovell, S.C., I.W. Davis, W.B. Arendall, P.I. W.D. Bakker, J.M. Word, M.G. Prisant, J.S. Richardson & D.C. Richardson. 2002. Structure validation by Calpha geometry: phi,psi and Cbeta deviation. *Proteins: Structure, Function & Genetics*, **50**: 437-450.
- Lukitaningsih, E., A.A. Mustikawaty & A. Sudarmanto. 2013. *Homology Modeling dan Molecular Docking Senyawa Aktif dari Bengkoang (Pachyrrhizus erosus) sebagai Inhibitor Tirosinase pada Homo sapiens*. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, **11(2)**: 134-141.

- Malau, N.D. & M. Sianturi. 2019. Analisa Interaksi Hidrofobik terhadap Kestabilan Termal Enzim Xilanase *Aspergillus niger*. *Jurnal EduMatSains*, **3(2)**: 215-227.
- Manca, A., S. Capsoni, A.D. Luzio, D. Vignone, F. Malerba, R. Brandi, F. Paoletti, I. Arisi, A. Cattaneo & R. Levi-Montalcini. 2011. Nerve Growth Factor Regulates Axial Rotation During Early Stages of Chick Embryo Development. *Journal PNAS*, **109(6)**: 2009-2014.
- Petsko, G.A. & D. Ringe. 2004. *Protein structure and function: from sequence to consequence*. New Science Press Ltd, London.
- Pranoto. 2013. *Ikatan Hidrogen*. Universitas Brawijaya, Malang.
- Rachmania, R. A., Supandi & O.A. Larasati. 2015. Analisis *In-silico* Senyawa Diterpenoid Lakto Herba Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) pada Reseptor *Alpha-Glucosidase* Sebagai Antidiabetes Tipe II. *PHARMACY*, **12(02)**: 210-222.
- Rekik, I., Z. Chaabene, C.D. Grubb, N. Drira, F. Cheour & A. Elleuch. 2015. In Silico Characterization and Molecular Modeling of Double-strand Break Repair Protein MRE11 from Phoenix Dactylifera V Deglet Nour. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, **12(23)**: 3-14.
- Sehar, U., M.A. Mehmood, Z. S.N. Nawaz, K. Husain, I. Sohail, M. Rizwan, T. Saba, T. Gill & A. Saqib. 2013. Three Dimensional (3D) Structure Prediction and Substrate-Protein Interaction Study of the Chitin Binding Protein CBP24 from *B. thuringiensis*. *Journal Bioinformation*, **9(14)**: 725-729.
- Seprianto. 2018. *Bioinformatika untuk Protein Modelling*. Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri Indonesia, Universitas Esa Unggul Press.
- Shaikh, S.S., M.S. Nahorski & C.G. Woods. 2018. "A Third HSAN5 Mutation Disrupts the Nerve Growth Factor Furin Cleavage Site". *Molecular Pain*, **14**: 1-11.
- Sheu, S., E.W. Schlag, H.L. Selzle & D. Yang. 2009. Hydrogen Bonds in Membrane Proteins. *J. Phys. Chem. B.*, **113**: 5318-5326.
- Sumarlin, L.O., S. Nurbayti & S. Fauziah. 2013. Penghambatan Enzyme Pemecah Protein(Papain) Oleh Ekstrak Rokok, Minuman Beralkohol dan kopi secara *in vitro*. **2(3)**: 449-458.
- Westbrook, J., Z. Feng., L. Chen., H. Yang & H. M. Berman. 2003. The Protein Data Bank and structural genomics. *Nucleic Acids Res.* **31**: 489-491.
- Zhan, Y & S. Guo. 2015. Three-dimensional (3D) Structure Prediction and Function Analysis of the Chitin-Binding Domain 3 Protein HD73_3189 from *Bacillus thuringiensis* HD73. *Bio-Medical Materials and Engineering*, **26**: 2019-2024.