DINAMIKA KONFORMASI DAN PROFIL ENERGI BEBAS KOMPLEKS ATG101–ATG13HORMA SELAMA INISIASI AUTOFAGI

Dian Fitrasari [1*], Acep Purqon [2]
[1]Jurusan Pendidikan Fisika, Fakultas Tarbiyah dan Keguruan, UIN Alauddin Makassar, Indonesia
[2]Fisika Bumi dan Sistem Kompleks, Institut Teknologi Bandung, Indonesia
**Corresponding Author:* dian.fitrasari@uin-alauddin.ac.id

ABSTRAK

Autofagi adalah proses katabolik yang terkonservasi dan penting untuk homeostasis seluler, yang diatur secara ketat oleh interaksi protein-protein dalam kompleks multiprotein. Di antara kompleks tersebut, heterodimer ATG13–ATG101 berfungsi sebagai perancah penting yang menghubungkan sinyal autofagi hulu dengan efektor hilir, tetapi dinamika konformasi dan kontribusi energi masing-masing subunitnya belum banyak dipahami. Penelitian ini bertujuan mengkarakterisasi dinamika konformasi dan profil energi bebas kompleks ATG13–ATG101 selama inisiasi autofagi. Metode yang digunakan adalah studi komputasional (in silico): struktur kristal ATG13–ATG101 (PDB ID: 5XUY) dikonversi menjadi model coarse-grained dan disimulasikan dengan Coarse-Grained Molecular Dynamics (CG-MD) medan gaya MARTINI 2.1 menggunakan NAMD 3.0.1 pada 310 K dan 1 atm selama 105,44 ns. Lintasan dianalisis dengan Root Mean Square Deviation (RMSD), Root Mean Square Fluctuation (RMSF), jarak pusat massa, fungsi distribusi radial, dan luas permukaan yang dapat diakses pelarut (SASA), serta dengan Free Energy Perturbation (FEP) pada dua keadaan konformasi. Hasil menunjukkan RMSD stabil pada kisaran 4–6 Å setelah 20 ns, domain HORMA yang kaku (RMSF < 2 Å), serta daerah loop dan terminal yang fleksibel (RMSF hingga 4–5 Å). Analisis FEP menghasilkan ΔG negatif pada ATG101 (−23,932 hingga −100,195 kkal/mol) dan ΔG positif pada ATG13 (9,430 hingga 37,044 kkal/mol), yang menyoroti peran penstabil dominan ATG101. Temuan ini memperkuat ketahanan struktural dan relevansi biologis kompleks ATG13–ATG101 dalam inisiasi autofagi, serta menawarkan wawasan mekanistik untuk penargetan terapeutik penyakit yang terkait dengan autofagi.

Keywords: *Autofagi; Interaksi Protein-Protein; FEP; Domain HORMA.*

ABSTRACT

Autophagy is a highly conserved catabolic process essential for cellular homeostasis, tightly regulated by protein-protein interactions within multiprotein complexes. Among these, the ATG13–ATG101 heterodimer is a critical scaffold linking upstream autophagy signals to downstream effectors, yet the conformational dynamics and the energetic contribution of each subunit remain poorly understood. This study aimed to characterize the conformational dynamics and free energy profile of the ATG13–ATG101 complex during autophagy initiation. We performed an in silico study: the crystal structure of ATG13–ATG101 (PDB ID: 5XUY) was converted into a coarse-grained model and simulated by Coarse-Grained Molecular Dynamics (CG-MD) with the MARTINI 2.1 force field in NAMD 3.0.1 at 310 K

and 1 atm for 105.44 ns. Trajectories were analyzed using Root Mean Square Deviation (RMSD), Root Mean Square Fluctuation (RMSF), center-of-mass distance, radial distribution function, and Solvent Accessible Surface Area (SASA), together with Free Energy Perturbation (FEP) calculations on two conformational states. RMSD stabilized at about 4–6 Å after 20 ns, the HORMA domains were rigid (RMSF < 2 Å), and loops and termini were flexible (RMSF up to 4–5 Å). FEP gave negative ΔG for ATG101 (−23.932 to −100.195 kcal/mol) and positive ΔG for ATG13 (9.430 to 37.044 kcal/mol), highlighting the dominant stabilizing role of ATG101. These findings reinforce the structural robustness and biological relevance of the ATG13–ATG101 complex in autophagy initiation and offer mechanistic insights for therapeutic targeting of autophagy-related diseases.

Keywords: *Autophagy; MARTINI; Protein-Protein Interactions; FEP; HORMA Domain.*

PENDAHULUAN

Autofagi adalah proses vital yang dilestarikan secara evolusioner yang menjaga homeostasis seluler dengan mendegradasi organel yang rusak, protein yang salah lipat, dan patogen yang menyerang (Nurdin, R. A., & Masdar, 2025). Proses ini berlangsung melalui urutan yang diatur secara ketat yang melibatkan inisiasi, nukleasi, elongasi, pematangan, dan fusi autofagosom bermembran ganda dengan lisosom. Pengaturan jalur ini bergantung pada jaringan interaksi protein-protein yang dinamis dan kompleks multiprotein.

Regulator hulu utama inisiasi autofagi pada mamalia adalah kompleks ULK1, yang terdiri dari ULK1/2, FIP200 (RB1CC1), ATG13, dan ATG101 (Herawati et al., 2022). Di antara komponen-komponen ini, ATG13 dan ATG101 berfungsi sebagai perancah penting yang menghubungkan sinyal hulu (misalnya, penghambatan mTOR) ke mekanisme autofagi hilir (Cao, W., Li, J., Yang, K., & Cao, 2021). Studi struktural menunjukkan bahwa ATG13 dan ATG101 mengandung domain HORMA yang mampu mengalami metamorfosis konformasi, bertindak sebagai saklar molekuler untuk perakitan kompleks. Interaksi ATG13–ATG101 telah terbukti menjadi penentu utama dalam pembentukan autofagosom, lebih penting daripada interaksi kompleks ULK1 lainnya (Wallot-Hieke, N., Verma, N., Schlütermann, D., Berleth, N., Deitersen, J., Böhler, P., Stuhldreier, F., Wu, W., Seggewiß, S., Peter, C., Gohlke, H., Mizushima, N., & Stork, 2018). Mutasi yang mengganggu interaksi ini merusak lipidasi LC3 dan aliran autofagi.

Selain itu, ATG101 menstabilkan ATG13 dan merekrut efektor hilir melalui motif WF dan domain C-terminalnya, menghubungkan kompleks ULK1 dengan kompleks PtdIns3K (Kim, B. W., Jin, Y., Kim, J., Kim, J. H., Jung, J., Kang, S., Kim, I. Y., Kim, J., Cheong, H., & Song, 2018). Analisis domain sistematis menunjukkan bahwa domain pengikat lipid ATG13 memengaruhi lokalisasi, sementara motif LIR-nya mungkin tidak diperlukan untuk induksi autofagi dalam kondisi tertentu. (Wallot-Hieke et al., 2018). Regulasi dinamis kompleks autofagi lebih lanjut diilustrasikan oleh interaksi protein-membran. Misalnya, domain RHD dari RETREG1/FAM134B mengalami perubahan konformasi berbentuk baji setelah berikatan dengan membran, memodifikasi membran ER untuk retikulofagi selektif (Popelka, H., & Klionsky, 2020). Pengelompokan RETREG1 memperkuat kelengkungan

lokal dan mendorong perekrutan fagofor (Poveda-Cuevas, S. A., Lohachova, K., Markusic, B., Dikic, I., Hummer, G., & M. Bhaskara, 2025).

Untuk menangkap sifat interaksi yang fleksibel dan seringkali sementara ini, simulasi *molecular dynamics* (*MD*) telah muncul sebagai alat penting. MD memungkinkan wawasan atomistik tentang pergeseran konformasi, plastisitas antarmuka, dan energi pengikatan (Mittal, R., Karki, U., Lemos, J. R., Chapagain, P., & Hirani, 2026). Teknik pengambilan sampel yang ditingkatkan dan model kasar seperti MARTINI memperluas skala waktu simulasi dan ukuran sistem, mendukung studi kompleks besar seperti ATG13–ATG101 (Karaca, E., Prévost, C., & Sacquin-Mora, 2022).

Selain dinamika struktural, wawasan termodinamika sangat penting. Metode FEP memungkinkan prediksi kuantitatif tentang bagaimana mutasi memengaruhi afinitas pengikatan dan stabilitas konformasi. Awalnya diterapkan dalam rekayasa antibodi (Chen et al., 2024). Pendekatan FEP dapat diadaptasi ke regulator autofagi untuk mengukur dampak energi dari perubahan konformasi atau substitusi residu (Fiesel, F. C., Fričová, D., Hayes, C. S., Coban, M. A., Hudec, R., Bredenberg, J. M., ... & Springer, 2023).

Selain protein individual, pendekatan proteomik seperti pemurnian afinitas spektrometri massa (AP-MS) dan pelabelan kedekatan spektrometri massa (PL-MS) mengungkapkan jaringan interaksi dan lingkungan protein yang mendorong autofagi (Siva Sankar, D., & Dengjel, 2021). Metode-metode ini mengungkap interaksi stabil dan sementara serta hubungan spasial-temporal di antara komponen-komponen autofagi, seperti LC3, OPTN, TBC1D14, dan HK2, yang berkontribusi pada mitofagi dan bentuk selektif lainnya.

Selain itu, autofagi berkaitan dengan metabolisme kanker. Autofagi bertindak sebagai penekan tumor dengan menghilangkan organel yang rusak dan mengurangi ROS (Reactive Oxygen Species), Selain itu, sel ini juga mendukung tumor yang sudah terbentuk dengan menyediakan substrat metabolik dan meningkatkan kelangsungan hidup di bawah tekanan. (Goldsmith, J., Levine, B., & Debnath, 2014). Peran ganda autofagi dalam kanker menggarisbawahi perlunya memahami regulasinya baik pada tingkat struktural maupun sistemik.

Permasalahan utama dalam penelitian ini adalah belum diketahuinya bagaimana dinamika konformasi antarmuka ATG13–ATG101 dan seberapa besar kontribusi energi masing-masing subunit terhadap stabilitas kompleks. Meskipun struktur kristal heterodimer ATG13–ATG101 telah dipecahkan (Qi et al., 2015) dan peran domain HORMA telah dipelajari melalui analisis struktural, mutasi, dan domain (Kim et al., 2018; Wallot-Hieke et al., 2018; Nguyen & Faesen, 2024), informasi tersebut sebagian besar menggambarkan struktur statis atau hasil eksperimen biokimia dan seluler. Secara spesifik, belum jelas bagaimana antarmuka dan daerah fleksibel kompleks ini berperilaku secara dinamis dalam lingkungan terlarut, serta seberapa besar kontribusi energi masing-masing subunit (ATG13 dan ATG101) terhadap stabilitas kompleks. Pertanyaan ini penting karena stabilitas antarmuka ATG13–ATG101 menentukan kemampuan kompleks sebagai perancah inisiasi autofagi, dan pemahaman kuantitatif tentang kontribusi energinya diperlukan untuk

merancang mutagenesis terarah maupun penargetan terapeutik pada penyakit yang terkait disregulasi autofagi, seperti kanker dan neurodegenerasi.

Penelitian ini berbeda dari penelitian terdahulu pada tiga hal. Pertama, dinamika kompleks dikaji melalui simulasi CG-MD berskala sekitar 105 ns, bukan hanya dari struktur kristal yang statis. Kedua, kontribusi energi bebas dihitung per rantai (A–D) menggunakan FEP pada dua keadaan konformasi, sehingga asimetri kontribusi ATG13 dan ATG101 dapat dikuantifikasi. Ketiga, analisis struktural (RMSD, RMSF, COM, g(r), SASA) dan energetik diintegrasikan dalam satu kerangka kerja, sehingga stabilitas konformasi dapat dihubungkan langsung dengan profil energinya. Sepengetahuan penulis, pendekatan terintegrasi ini belum banyak dilaporkan untuk kompleks ATG13–ATG101.

Tujuan utama penelitian ini adalah mengkarakterisasi dinamika konformasi dan profil energi bebas kompleks ATG13–ATG101 selama inisiasi autofagi. Secara spesifik, penelitian ini bertujuan (1) menilai stabilitas struktural dan fleksibilitas kompleks menggunakan simulasi CG-MD (RMSD, RMSF, jarak COM, g(r), dan SASA); (2) mengkuantifikasi kontribusi energi bebas masing-masing subunit melalui perhitungan FEP pada dua keadaan konformasi; dan (3) mengidentifikasi subunit dan daerah yang berperan dominan dalam menstabilkan antarmuka sebagai dasar mekanistik bagi penargetan terapeutik.

METODE

Jenis penelitian ini adalah penelitian komputasional (in silico) eksploratif-kuantitatif dengan pendekatan simulasi CG-MD yang dilengkapi perhitungan FEP. Teknik analisis yang digunakan adalah analisis kuantitatif deskriptif terhadap trajektori simulasi (RMSD, RMSF, jarak COM, g(r), dan SASA) serta analisis termodinamika berbasis FEP untuk memperoleh ΔG setiap rantai. Prosedur penelitian terdiri atas lima tahap: (1) pemodelan protein dan coarse-graining dari struktur kristal ATG13–ATG101 (PDB ID: 5XUY); (2) penyiapan sistem melalui solvasi dan ionisasi; (3) simulasi dinamika molekuler yang meliputi minimisasi energi, ekuilibrasi, dan simulasi produksi; (4) analisis trajektori (RMSD, RMSF, COM, g(r), dan SASA); dan (5) perhitungan energi bebas dengan FEP pada dua keadaan konformasi. Seluruh komputasi dijalankan pada fasilitas MAHAMERU BRIN HPC.

1. Pemodelan Protein dan Coarse-Graining

Struktur awal resolusi atom dari protein terkait autofagi manusia ATG13 dan ATG101 diperoleh melalui data difraksi sinar-X (Protein Data Bank (PDB) ID: 5XUY). Struktur yang diperoleh secara eksperimental (total 5942 atom, berdasarkan data kristalografi sinar-X yang tersedia) dikonversi menjadi model CG yang terdiri dari 1747 butiran menggunakan medan gaya MARTINI 2.1 dan coarse graining tcl. (01-coarse-grain.tcl, 02a-make-initial-CG-psf.tcl, 02b-correct-CG-psf.tcl, 03a-solvate.tcl, 03b-remove-waters.tcl, 04-ionize.tcl) Skrip diimplementasikan melalui Visual Molecular Dynamics (VMD) versi 1.9.3. Pengurangan detail atomik ini memungkinkan simulasi skala waktu panjang yang efisien sambil mempertahankan sifat fisikokimia utama protein.

2. Pengaturan Sistem dan Solvasi

Kompleks ATG13–ATG101 dimasukkan ke dalam kotak air BP4 (partikel antibeku besar) menggunakan kondisi batas periodik. Dimensi kotak simulasi adalah 87,48 Å × 140,11

Å × 138,48 Å, yang berisi total 11.042 butiran air. Untuk meniru kondisi ionik fisiologis dan memastikan netralitas listrik, 12 ion Na^+ dan 9 ion Cl^- ditambahkan ke dalam sistem.

3. Simulasi Molecular Dynamics

Semua simulasi dilakukan menggunakan NAMD versi 3.0.1, yang dikonfigurasi untuk dinamika coarse-grained MARTINI. Sistem disimulasikan di bawah ensemble NPT, dengan mempertahankan tekanan dan suhu konstan. Simulasi dinamika molekuler dilakukan menggunakan medan gaya coarse-grained MARTINI 2.1, dengan langkah waktu integrasi 20 femtodetik (fs) untuk memastikan stabilitas numerik. Interaksi non-ikatan dipotong pada jarak cutoff 12 Å untuk menyeimbangkan efisiensi komputasi dan akurasi. Suhu dipertahankan pada 310 K menggunakan termostat Langevin, sementara tekanan dikontrol pada 1 atm menggunakan barostat piston Langevin. Kondisi batas periodik diterapkan di ketiga dimensi spasial untuk meniru sistem tak terbatas dan menghilangkan efek tepi.

Sistem menjalani minimisasi energi selama 5.000 langkah, diikuti oleh ekuilibrasi selama 1 ns. Kemudian dilakukan simulasi produksi selama 105,44 ns. Trajektori disimpan setiap 100 fs untuk analisis selanjutnya.

4. Teknik Analisis Trajektori

Analisis pasca-simulasi dilakukan menggunakan VMD dan skrip TCL internal pada trajektori produksi. RMSD dihitung untuk setiap rantai terhadap struktur awal pada setiap bingkai; RMSF dihitung per residu (backbone dan rantai samping) terhadap struktur rata-rata; jarak pusat massa (COM) dihitung antarpasangan rantai (A–B, A–C, A–D, B–C, B–D, dan C–D) dan dibandingkan dengan nilai pada struktur PDB; fungsi distribusi radial (g(r)) dihitung antarpasangan rantai untuk menilai jarak interaksi yang disukai; dan luas permukaan yang dapat diakses pelarut (SASA) dihitung untuk setiap rantai dan kompleks untuk menilai paparan pelarut serta kekompakan antarmuka. Kelima metrik tersebut digunakan untuk mengevaluasi stabilitas antarmuka dan fleksibilitas struktural ATG13–ATG101.

5. Perhitungan Energi Bebas (FEP)

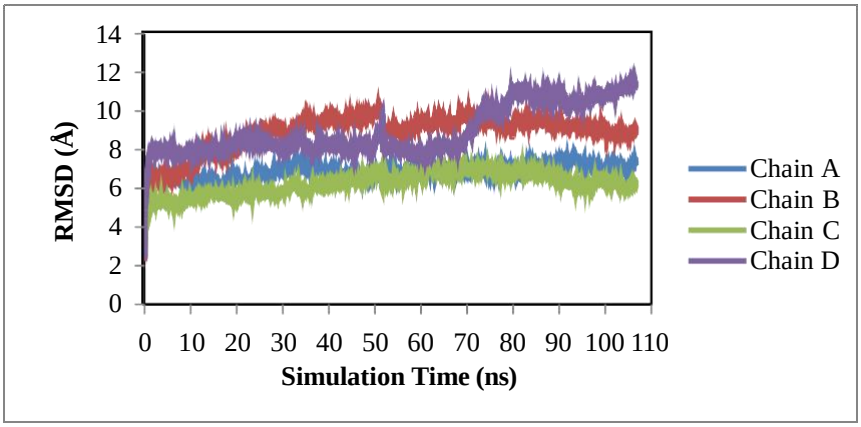
Kontribusi energi bebas pengikatan (ΔG) setiap rantai (A–D) dihitung dengan metode FEP pada dua keadaan konformasi. Keadaan 1 diambil dari tahap awal simulasi yang telah seimbang, sedangkan Keadaan 2 diambil dari tahap akhir simulasi yang lebih kompak; kedua keadaan dipilih berdasarkan pengelompokan (clustering) trajektori dan plateau RMSD. Untuk setiap rantai, perturbasi alkimia dilakukan dengan menandai rantai target (nilai +1,00 pada berkas penanda) sehingga interaksinya dengan sisa sistem dihilangkan secara bertahap dari keadaan berinteraksi ke keadaan tidak berinteraksi, dan ΔG diperoleh dari akumulasi perubahan energi sepanjang jalur perturbasi. Perhitungan dilakukan dengan NAMD 3.0.1 pada suhu 310 K dan tekanan 1 atm. Adapun jumlah jendela ialah 20. Total lama simulasi per jendela 500 ps per rantai. Koefisien pergeseran vdW 4,0 $Å^2$, alchVdwLambdaEnd 1,0. Elektrosatik mulai diaktifkan pada $\lambda = 0{,}5$. Estimator Zwanzig (rata-rata eksponensial satu arah), ΔG total dijumlahkan dari 20 jendela.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Stabilitas Struktural melalui Analysis RMSD

Untuk mengevaluasi stabilitas konformasi kompleks ATG13–ATG101 selama simulasi dinamika molekuler kasar (CG-MD), kami menganalisis deviasi akar kuadrat rata-rata (RMSD) dari setiap rantai seiring waktu. RMSD adalah metrik standar yang digunakan untuk

menilai tingkat penyimpangan struktural dari konfigurasi awal, memberikan pandangan global tentang dinamika protein dan perilaku kesetimbangan.



Gambar 1. Profil Deviasi Kuadrat Rata-rata (RMSD) kompleks ATG13–ATG101 selama simulasi MD kasar 106,64 ns, menunjukkan kesetimbangan cepat dalam 20 ns diikuti oleh stabilisasi struktural (~4–6 Å).

Pada fase awal simulasi (0–20 ns), nilai RMSD meningkat dengan cepat, mencerminkan kesetimbangan sistem saat menyesuaikan diri dari struktur awal kristalografinya (PDB ID: 5XUY) ke konformasi terlarut yang stabil. Setelah itu, nilai RMSD mencapai titik jenuh dan berfluktuasi dalam rentang yang sempit (~4–6 Å), menunjukkan bahwa kompleks ATG13–ATG101 mencapai kesetimbangan dinamis tanpa mengalami penataan ulang konformasi atau destabilisasi yang signifikan.

Tingkat RMSD ini berada dalam kisaran yang diharapkan untuk model berbutir kasar MARTINI 2.1, yang dirancang untuk mengurangi detail atom sambil mempertahankan fitur struktural penting (Marrink et al., 2007; Souza et al., 2021). Stabilisasi yang diamati mendukung kesimpulan bahwa kompleks tersebut mempertahankan arsitektur keseluruhan dan integritas antarmuka di bawah kondisi fisiologis yang disimulasikan.

Stabilitas struktural yang diamati di sini konsisten dengan temuan eksperimental, yang menunjukkan sifat kuat antarmuka ATG13–ATG101 yang dimediasi oleh interaksi domain HORMA (Kim et al., 2018; Wallot-Hieke et al., 2018). Selain itu, menjaga antarmuka yang stabil ini sangat penting untuk fungsi perancah kompleks dalam inisiasi autofagi dan perekrutan efektor hilir.

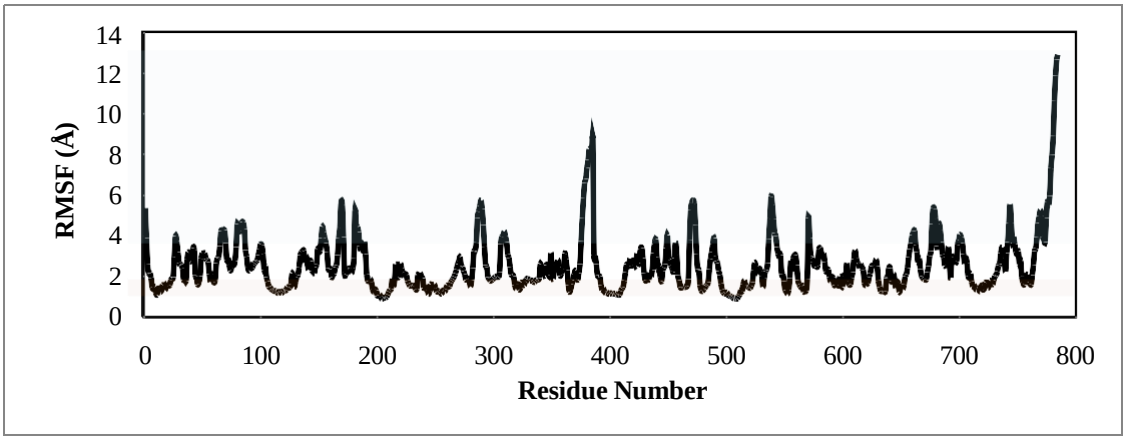
Lebih lanjut, tidak ditemukannya peningkatan RMSD secara terus-menerus setelah fase ekuilibrasi mengindikasikan bahwa interaksi antarmuka tetap terpelihara selama simulasi. Hal ini penting secara biologis karena ATG13 dan ATG101 merupakan komponen penting dalam pembentukan kompleks inisiasi autofagi, sehingga kestabilan arsitektur kompleks diperlukan untuk mempertahankan fungsi perancah dan memungkinkan koordinasi perekrutan komponen autofagi lainnya (Kotani, T., & Nakatogawa, 2026). Dengan kata lain, hasil simulasi tidak hanya menunjukkan kestabilan struktur secara fisik, tetapi juga mendukung model struktural yang telah dikemukakan berdasarkan studi eksperimental sebelumnya.

Secara keseluruhan, pola RMSD yang menunjukkan peningkatan awal diikuti oleh plateau dan fluktuasi terbatas memberikan bukti bahwa kompleks ATG13–ATG101 mencapai keadaan dinamis yang stabil sepanjang simulasi. Kesesuaian antara profil RMSD,

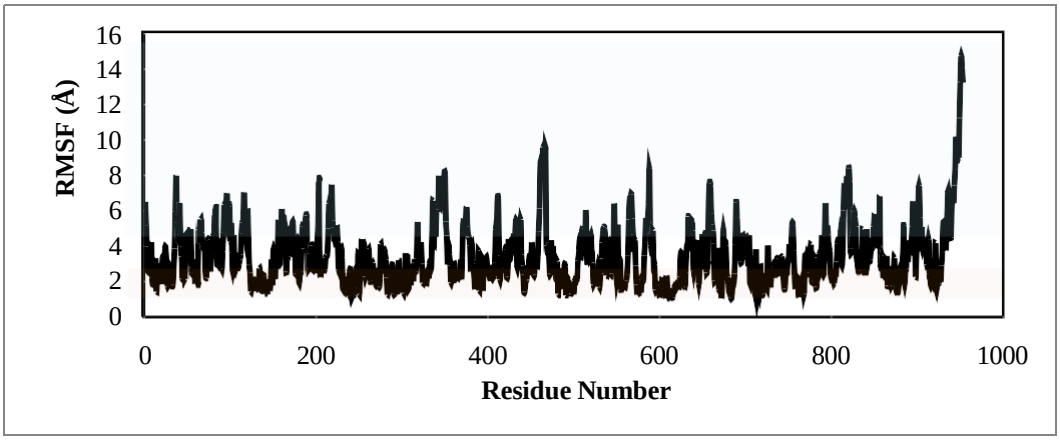
karakteristik model MARTINI 2.1, dan bukti eksperimental mengenai kestabilan interaksi ATG13–ATG101 memperkuat validitas lintasan simulasi yang diperoleh. Oleh karena itu, lintasan tersebut dapat digunakan sebagai dasar yang memadai untuk analisis lanjutan, termasuk karakterisasi interaksi melalui fungsi distribusi radial, evaluasi perubahan kontak antarmuka, serta estimasi kontribusi energi melalui pendekatan free-energy perturbation (FEP)

2. Pemetaan Profil Fleksibilitas melalui Analisis RMSF

Untuk mengevaluasi fleksibilitas tingkat residu dari kompleks ATG13–ATG101, kami melakukan analisis Root Mean Square Fluctuation (RMSF) pada atom backbone dan rantai samping. RMSF mengukur fluktuasi posisi rata-rata waktu dari setiap residu relatif terhadap struktur rata-rata, sehingga mengungkapkan wilayah protein mana yang menunjukkan tingkat mobilitas atau kekakuan yang lebih tinggi selama simulasi.



Gambar 2. Analisis Root Mean Square Fluctuation (RMSF) atom-atom backbone, menyoroti kekakuan pada domain HORMA dan fleksibilitas pada loop perifer dan wilayah terminal.



Gambar 3. Distribusi RMSF rantai samping ATG13 dan ATG101. Residu yang terpapar permukaan fleksibel menunjukkan fluktuasi yang lebih besar, sesuai dengan wilayah pengaturan yang dinamis.

Profil RMSF menunjukkan bahwa domain HORMA dari ATG13 dan ATG101 yang

terletak di inti kompleks menunjukkan nilai fluktuasi yang relatif rendah (< 2 Å). Hasil ini mendukung peran domain HORMA yang telah diketahui sebagai kerangka kaku untuk interaksi protein-protein yang stabil, konsisten dengan studi struktural yang menunjukkan arsitektur domain yang terkonservasi dan variasi konformasi yang terbatas (Kim et al., 2018; Wallot-Hieke et al., 2018).

Sebaliknya, daerah loop dan segmen terminal menunjukkan nilai RMSF yang jauh lebih tinggi, dalam beberapa kasus melebihi 4–5 Å, yang mengindikasikan peningkatan fleksibilitas. Daerah dinamis ini kemungkinan terlibat dalam mengakomodasi perubahan konformasi selama perakitan kompleks, terlibat dalam interaksi sementara dengan protein terkait autofagi lainnya, dan berfungsi sebagai situs pengaturan potensial yang dipengaruhi oleh modifikasi pasca-translasi.

Analisis RMSF rantai samping menunjukkan tren serupa, dengan rantai samping fleksibel terletak terutama pada residu yang terpapar permukaan. Hal ini konsisten dengan ekspektasi dalam simulasi CG-MD, di mana daerah yang menghadap pelarut yang tidak terlalu dibatasi menunjukkan pergerakan yang lebih besar (Marrink, S. J., Risselada, H. J., Yefimov, S., Tieleman, D. P., & De Vries, 2007)(Souza, P. C. T., Alessandri, R., Barnoud, J., Thallmair, S., Faustino, I., Grünewald, F., Patmanidis, I., Abdizadeh, H., Bruininks, B. M. H., Wassenaar, T. A., Kroon, P. C., Melcr, J., Nieto, V., Corradi, V., Khan, H. M., Domański, J., Javanainen, M., Mar, 2021)

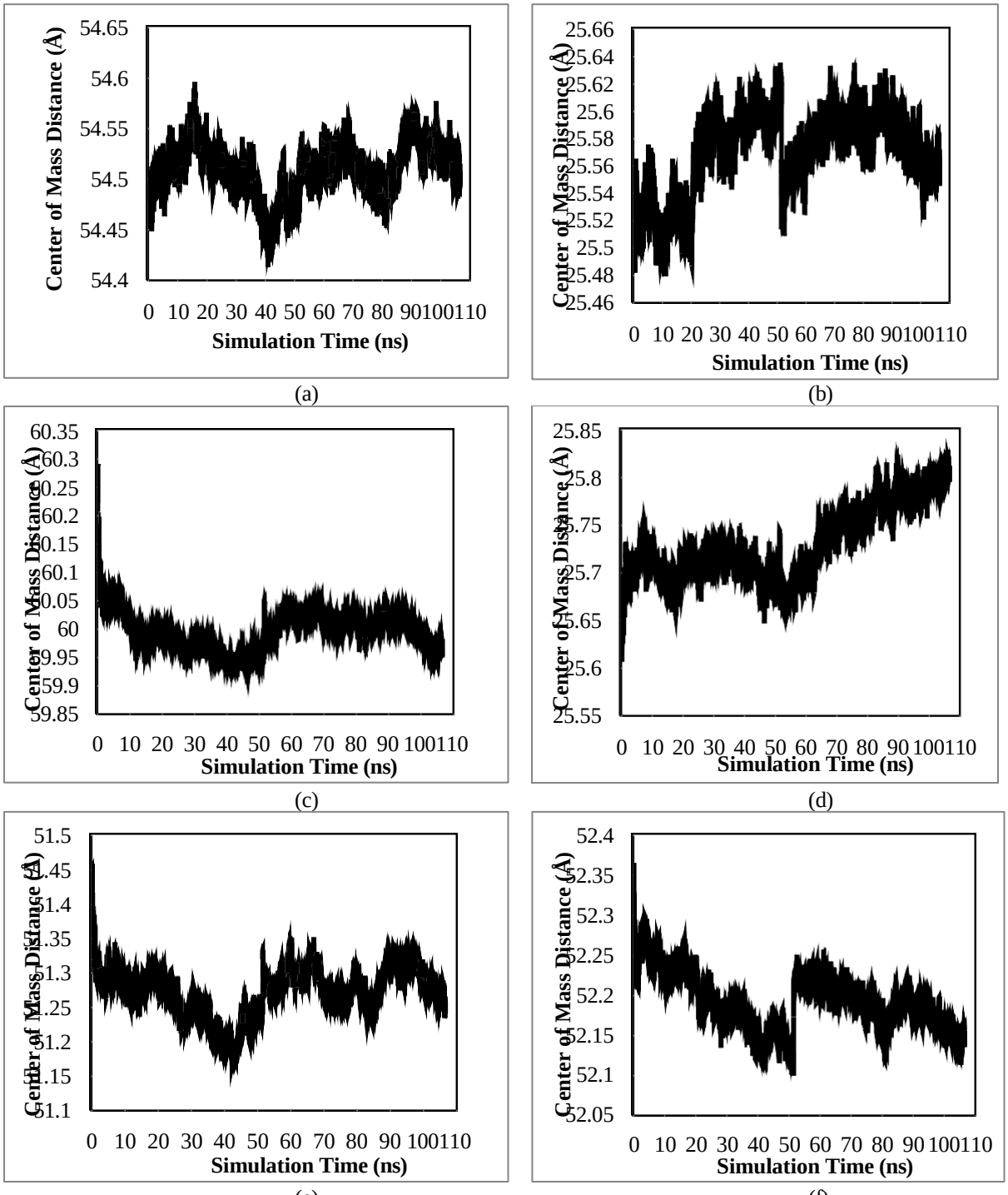
Pola domain inti yang kaku dan daerah permukaan/lingkaran yang fleksibel ini merupakan karakteristik protein pensinyalan multi-domain dan telah diamati pada autofagi lainnya (Siva Sankar & Dengjel, 2021). Keberadaan bersamaan wilayah yang kaku dan dinamis dalam kompleks ATG13–ATG101 mendukung peran gandanya sebagai kerangka sinyal yang stabil dan platform fleksibel untuk perekrutan dinamis efektor autofagi (Nguyen, A., & Faesen, 2024).

Secara keseluruhan, analisis RMSF menyoroti ketahanan struktural antarmuka interaksi dan mengungkapkan wilayah fleksibel yang berpotensi relevan secara fungsional yang dapat memediasi interaksi atau peralihan regulasi selama inisiasi autofagi.

3. Stabilitas Spasial Antar-Subunit melalui Analisis Jarak COM dan Fungsi Distribusi Radial

3.1 Analisis Jarak Center of Mass (COM)

Untuk mengevaluasi stabilitas spasial dan posisi relatif subunit dalam kompleks ATG13–ATG101, kami menganalisis jarak Pusat Massa (COM) antara berbagai pasangan rantai selama simulasi berlangsung.



Gambar 4. Jarak pusat massa (COM) antara rantai A–B, A–C, B–D, dll., menunjukkan hubungan spasial antar-subunit yang stabil sepanjang waktu simulasi. (a) Jarak pusat massa (COM) antara rantai A (atg13) dan rantai C (atg13) (nilai PDB: 54,45 Å). (b) Jarak pusat massa (COM) antara rantai A (atg13) dan rantai B (atg101) (nilai PDB: 25,04 Å). (c) Jarak pusat massa (COM) antara rantai B (atg101) dan rantai D (atg101) (nilai PDB: 59,32 Å). (d) Jarak pusat massa (COM) antara rantai C (atg13) dan rantai D (atg101) (nilai PDB: 25,46 Å). (e) Jarak pusat massa (COM) antara rantai B (atg101) dan rantai C (atg13) (nilai PDB: 51,33 Å). (f) Jarak pusat massa (COM) antara rantai A (atg13) dan rantai D (atg101) (nilai PDB: 51,78 Å).

Jarak COM antara berbagai rantai termasuk Rantai A (ATG13) dan Rantai B (ATG101), Rantai A (ATG13) dan Rantai C (ATG13), Rantai B (ATG101) dan Rantai D (ATG101),

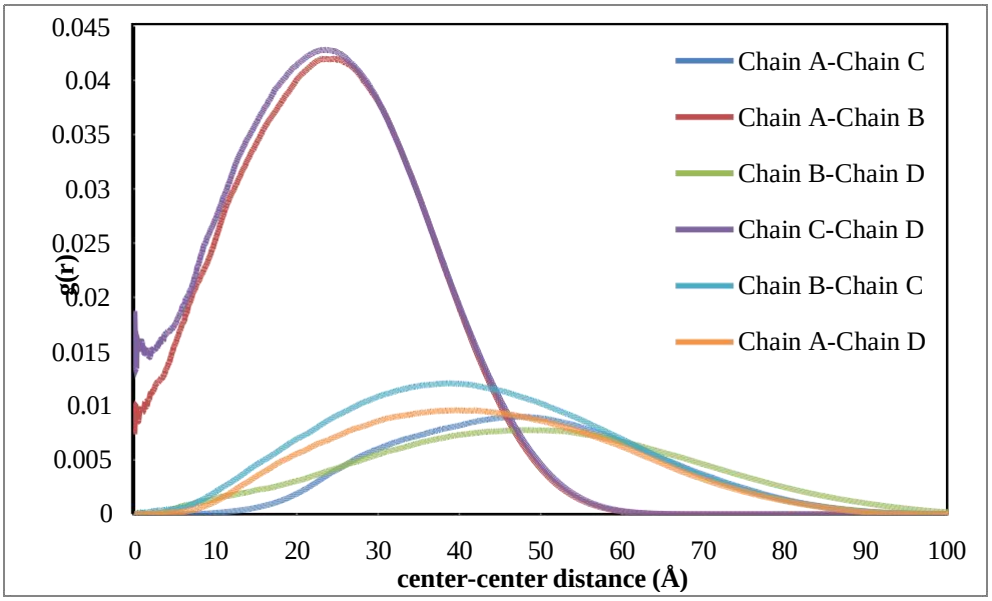
serta pasangan relevan lainnya tetap mendekati jarak awal yang diperoleh dari PDB (misalnya, ~25 Å untuk ATG13–ATG101, ~54 Å untuk ATG13–ATG13). Hal ini menunjukkan tidak terjadi disosiasi atau penataan ulang besar-besaran antara subunit-subunit ini selama simulasi.

Stabilitas COM tersebut mendukung hipotesis bahwa kompleks ATG13–ATG101 membentuk kerangka interaksi yang stabil, kemungkinan dipertahankan oleh antarmuka domain HORMA yang terkonservasi. Temuan ini sejalan dengan studi struktural sebelumnya yang menunjukkan interaksi heterodimerik yang erat antara domain HORMA ATG13 dan ATG101 (Kim et al., 2018; Qi et al., 2015).

Mempertahankan jarak ini sepanjang simulasi jangka panjang membuktikan kekokohan medan gaya MARTINI (Marrink et al., 2007; Souza et al., 2021) dan mendukung penggunaan CG-MD untuk menangkap perilaku konformasi kompleks terkait autofagi multi-subunit.

3.2 Analisis Fungsi Distribusi Radial (g(r))

Fungsi distribusi pasangan radial (g(r)) mengukur probabilitas menemukan satu kelompok atom (misalnya, ATG101) pada jarak tertentu dari kelompok atom lain (misalnya, ATG13), relatif terhadap distribusi acak. Metrik ini memberikan wawasan tentang jarak interaksi yang disukai dan stabilitas antarmuka.



Gambar 5. Fungsi distribusi radial (g(r)) dari pasangan rantai, memperlihatkan puncak tajam pada ~25 Å untuk interaksi ATG13–ATG101, konsisten dengan pengikatan spesifik dan persisten.

Pada pasangan subunit ATG13–ATG101, analisis g(r) mengungkapkan puncak yang menonjol dan tajam pada sekitar 25 Å antara rantai ATG13 dan ATG101 (A–B, C–D), yang konsisten dengan ikatan yang ketat dan spesifik. Sebaliknya, puncak yang lebih lebar dan lebih rendah diamati pada pasangan ATG13–ATG13 (A–C) dan ATG101–ATG101 (B–D), yang menunjukkan kontak yang lebih sementara atau perifer dalam susunan homodimerik. Selain itu, keberadaan puncak sekunder pada beberapa pasangan rantai menunjukkan gerakan pernapasan konformasi, tetapi bukan disosiasi.

Preferensi spasial ini menegaskan bahwa interaksi ATG13–ATG101 lebih terstruktur dan spesifik dibandingkan interaksi antar-rantai lainnya. Hal ini mencerminkan fungsi

biologis kompleks ini dalam menopang kinase ULK1 dan merekrut faktor-faktor autofagi lainnya (Siva Sankar & Dengjel, 2021; Wallot-Hieke et al., 2018).

Selain itu, analisis g(r) sangat berguna dalam model CG, di mana resolusi atom dikurangi tetapi perilaku ensemble dan kecenderungan interaksi dipertahankan selama simulasi panjang. (Souza et al., 2021). Puncak-puncak yang teramati selaras dengan puncak-puncak yang diharapkan dari struktur kristal eksperimental dan studi simulasi sebelumnya (Qi, S., Kim, D. J., Stjepanovic, G., & Hurley, 2017).

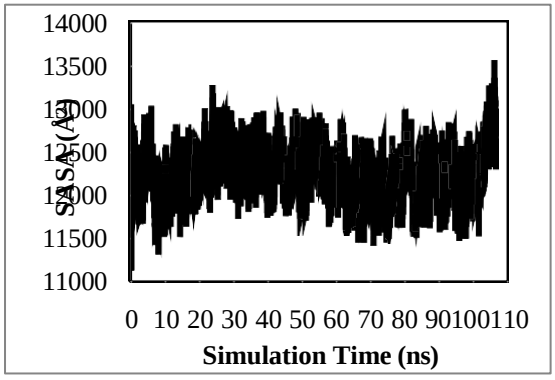
3.3 Interpretasi dan Relevansi

Secara bersamaan, analisis COM dan g(r) menunjukkan stabilitas antarmuka kunci dalam kompleks ATG13–ATG101 dan memvalidasi persistensi struktural interaksi yang dimediasi domain HORMA. Temuan ini mendukung hipotesis bahwa kompleks ini berfungsi sebagai platform rekrutmen yang stabil dalam jalur inisiasi autofagi. Selain itu, hasil tersebut menyoroti kegunaan CG-MD dalam menyelesaikan hubungan spasial dan lanskap interaksi dalam sistem multi-protein.

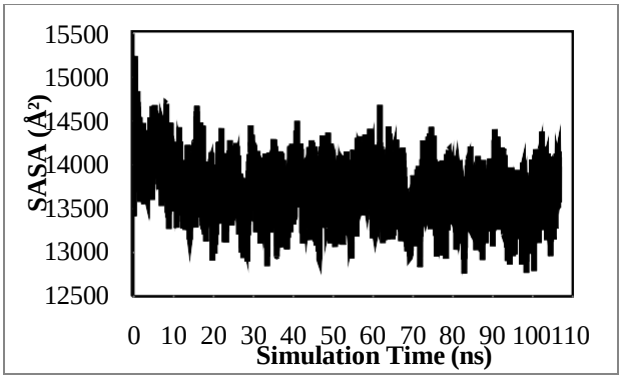
Metrik spasial ini memperkuat peran sentral ATG13–ATG101 dalam mengatur peristiwa pensinyalan hulu selama autofagi dan menunjukkan bahwa gangguan perilaku COM/g(r) dapat mengindikasikan mutasi yang relevan secara fungsional atau antarmuka yang dapat dijadikan target obat dalam studi di masa mendatang.

4. Aksesibilitas Pelarut dan Kekompakan Antarmuka melalui Analisis SASA

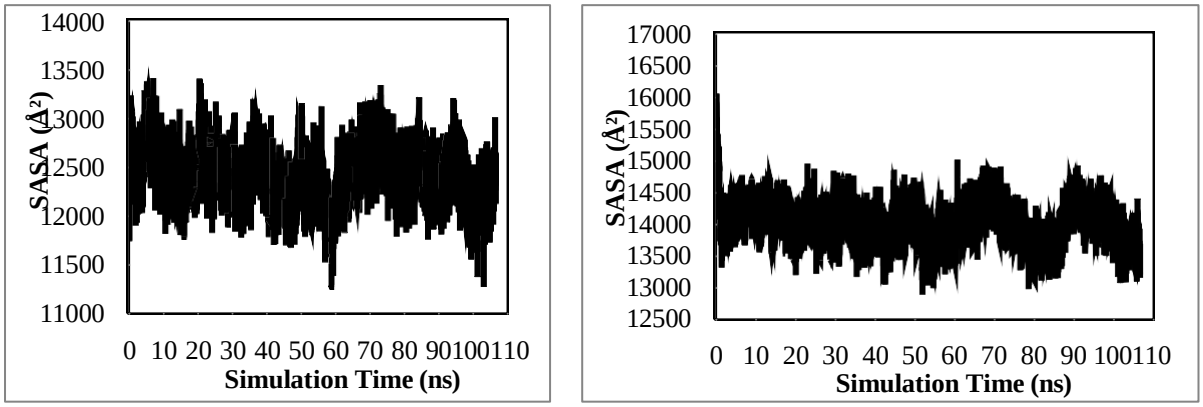
Untuk menyelidiki paparan pelarut dan kekompakan kompleks ATG13–ATG101, kami melakukan analisis Luas Permukaan yang Dapat Diakses Pelarut (SASA) sepanjang simulasi. SASA mencerminkan luas permukaan biomolekul yang dapat diakses oleh pelarut (biasanya air), dan perubahan SASA dapat mengungkapkan fitur-fitur penting seperti penguburan antarmuka, penataan ulang domain, atau transisi konformasi.



(a)



(b)



(c) (d)

Gambar 6. Analisis Luas Permukaan yang Dapat Diakses Pelarut (SASA) dari setiap rantai dan kompleks. Penurunan awal yang sedikit mencerminkan pemadatan, sementara nilai SASA yang stabil mengkonfirmasi integritas struktural. (a) SASA rantai A. (b) SASA rantai B. (c) SASA rantai C. (d) SASA rantai D.

4.1. Pola SASA Selama Simulasi

Luas permukaan spesifik total (SASA) kompleks ATG13–ATG101 tetap relatif konstan setelah fase ekuilibrasi awal, dengan hanya fluktuasi kecil yang diamati sepanjang proses produksi. Hal ini menunjukkan bahwa struktur keseluruhan kompleks tetap kompak dan stabil, tanpa peristiwa pelipatan yang signifikan atau paparan residu yang biasanya tersembunyi. Selain itu, antarmuka interaksi antara ATG13 dan ATG101 tetap terkemas dengan baik dan terlindungi dari pelarut, sesuai dengan heterodimer yang stabil.

Perlu dicatat, sedikit penurunan SASA diamati pada tahap awal simulasi (0–20 ns), yang sesuai dengan relaksasi sistem ke dalam konformasi yang lebih menguntungkan secara energetik. Penurunan tersebut menunjukkan pengemasan domain yang lebih rapat atau optimasi antarmuka, sebuah pengamatan umum dalam simulasi dinamika molekuler kasar (CG-MD) kompleks protein (Marrink et al., 2007; Souza et al., 2021).

4.2. Relevansi Biologis

Terkuburnya permukaan hidrofobik pada antarmuka ATG13–ATG101 sudah diperkirakan, mengingat data struktural menunjukkan bahwa domain HORMA mereka terlibat dalam interaksi yang erat.

Perlindungan antarmuka dari pelarut ini sangat penting untuk menjaga integritas kompleks, mencegah agregasi nonspesifik, dan memfasilitasi perekrutan protein autofagi hilir, seperti FIP200 dan WIPI2 (Kim et al., 2018; Wallot-Hieke et al., 2018; (Chen, P., Liu, G., Yin, J., Sun, L., Wang, X., Wang, B., ... & Luo, 2026).

Peningkatan SASA di daerah loop atau segmen terminal, di sisi lain, menguntungkan secara fungsional, karena area fleksibel yang terpapar pelarut ini sering berfungsi sebagai titik interaksi atau daerah pengaturan yang tunduk pada modifikasi pasca-translasi (Siva Sankar & Dengjel, 2021).

4.3. SASA sebagai Indikator Stabilitas

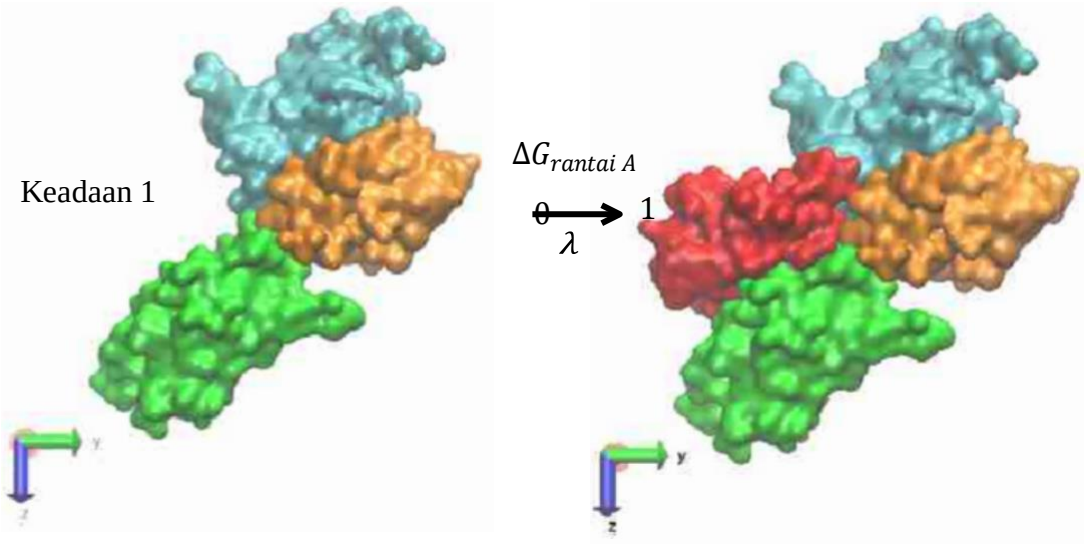
Konsistensi nilai SASA dari waktu ke waktu mendukung stabilitas termodinamika kompleks ATG13–ATG101 dalam lingkungan terlarut yang menyerupai kondisi fisiologis.

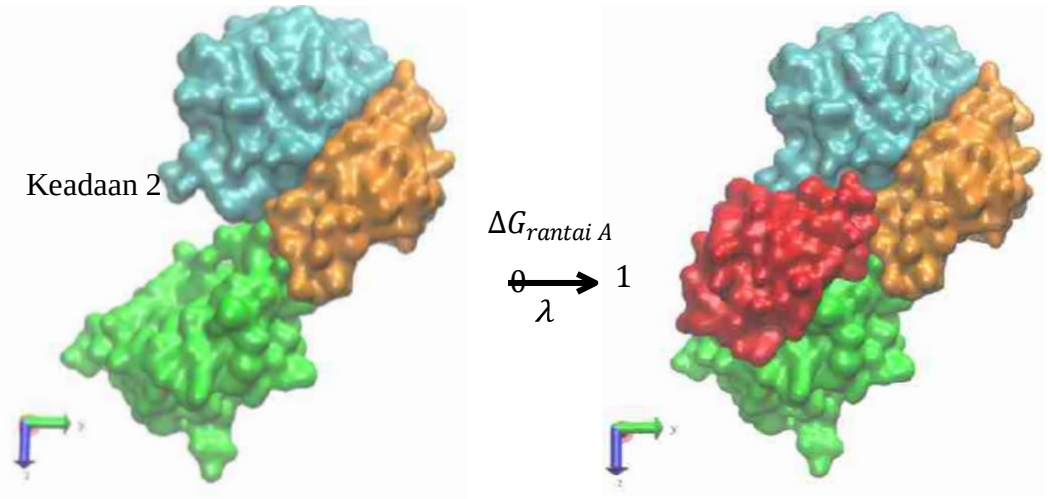
Dikombinasikan dengan data RMSD dan COM, SASA memberikan validasi pelengkap bahwa interaksi protein-protein tetap utuh dan tidak mengalami disosiasi atau denaturasi parsial. Temuan ini sangat penting dalam konteks inisiasi autofagi, di mana stabilitas struktural kompleks perancah hulu sangat penting untuk mengatur interaksi dinamis dengan efektor hilir (Popelka & Klionsky, 2020; Qi et al., 2015).

6. Analisis Energi Bebas antara Dua Keadaan

Untuk menjelaskan kontribusi energi dari setiap subunit dalam kompleks ATG13–ATG101, kami melakukan perhitungan Perturbasi Energi Bebas (FEP) di dua keadaan konformasi yang ditentukan. Alur kerja FEP diilustrasikan pada Gambar 7, di mana rantai individu ditandai dengan nilai +1,00 di Keadaan 1 atau Keadaan 2 untuk mensimulasikan pemisahan bertahap dan menghitung energi bebas pengikatan (ΔG) yang terkait. Pendekatan perturbasi alkimia ini menangkap stabilitas relatif dan kekuatan interaksi setiap subunit di bawah transisi konformasi.

Gambar 7 menyajikan skema komputasi berbasis FEP untuk setiap rantai, yang melibatkan transformasi seperti mutasi dari keadaan berinteraksi ke keadaan tidak berinteraksi dalam dua ensemble konformasi. Keadaan 1 sesuai dengan konformasi yang seimbang pada tahap simulasi awal, sedangkan Keadaan 2 mencerminkan keadaan yang lebih kompak di tahap selanjutnya dengan peningkatan asosiasi ATG101. Keadaan-keadaan ini dipilih berdasarkan pengelompokan lintasan dan pengamatan plateau RMSD.





Gambar 7. Skema alur kerja analisis Perturbasi Energi Bebas (FEP) yang mengilustrasikan komputasi dua keadaan energi bebas pengikatan (ΔG) untuk setiap rantai dalam kompleks ATG13–ATG101. Perhitungan FEP melibatkan penandaan rantai target dengan +1,00 dalam keadaan yang berbeda untuk memperkirakan variasi ΔG, sehingga memungkinkan penilaian stabilisasi antar-subunit setelah transisi konformasi.

Hasilnya dirangkum dalam Tabel 1, menunjukkan bahwa ATG101 (rantai B dan D) memberikan kontribusi signifikan terhadap stabilitas termodinamika kompleks. Secara khusus, rantai D pada Keadaan 1 menunjukkan ΔG sebesar −100,195 kkal/mol, menjadi kurang negatif (−43,940 kkal/mol) pada Keadaan 2, menunjukkan ikatan yang berkurang tetapi masih menguntungkan. Sementara itu, rantai B menunjukkan stabilitas yang lebih baik pada Keadaan 2 (−33,842 kkal/mol). Sebaliknya, rantai ATG13 (A dan C) secara konsisten menunjukkan nilai ΔG positif, mencerminkan kontribusi yang relatif tidak stabil, terutama rantai C pada Keadaan 2 (37,044 kkal/mol).

Tabel 1. Energi bebas pengikatan (ΔG, kkal/mol) dari masing-masing subunit ATG13–ATG101 yang dihitung melalui Perturbasi Energi Bebas (FEP) untuk Keadaan 1 dan Keadaan 2. Nilai ΔG menunjukkan perubahan energi yang signifikan, terutama pada rantai D (ATG101), antara dua keadaan konformasi.

Rantai	$\Delta G_{rantai\ A}$ (kcal/mol)	
	Keadaan 1	Keadaan 2
A	9.430	25.145
B	-23.932	-33.842
C	25.549	37.044
D	-100.195	-43.940

Temuan ini menyoroti lanskap energi asimetris di dalam kompleks, dengan ATG101 memainkan peran yang lebih dominan dalam menstabilkan antarmuka interaksi. Pengamatan ini sejalan dengan studi struktural sebelumnya yang menunjukkan pentingnya domain HORMA ATG101 dalam menghubungkan ULK1 ke mesin autofagi hilir (Kim et al., 2018;

Qi et al., 2015) dan mendukung relevansi fungsionalnya sebagai unit perancah..
Selain itu, penerapan FEP dalam konteks ini menunjukkan nilainya dalam mengukur energi antar-subunit dalam kompleks besar, berdasarkan keberhasilan sebelumnya dalam desain antibodi dan rekayasa protein (La Serra, M. A., Vidossich, P., Acquistapace, I., Ganesan, A. K., & De Vivo, 2022); (Zhu, F., Bourguet, F. A., Bennett, W. F. D., Lau, E. Y., Arrildt, K. T., Segelke, B. W., Zemla, A. T., Desautels, T. A., & Faissol, 2022). Perhitungan ini memberikan alasan yang kuat untuk persistensi struktural yang diamati dalam simulasi CG dan dapat memandu upaya mutagenesis atau penargetan obat di masa depan yang berfokus pada mengganggu atau menstabilkan antarmuka autophagy utama.

7. Relevansi dan Implikasi Biologis

Kompleks ATG13–ATG101 memainkan peran sentral dalam mengoordinasikan inisiasi autofagi dengan menghubungkan sinyal ULK1 hulu ke efektor autofagi hilir. Simulasi kami menyoroti sifat dinamis namun stabil dari antarmuka ATG13–ATG101, yang dimediasi terutama oleh interaksi domain HORMA. Fleksibilitas konformasi yang diamati pada daerah loop dan kontribusi ΔG yang berbeda-beda menunjukkan bahwa kompleks tersebut dapat beradaptasi secara struktural sambil mempertahankan fungsi penyanggaannya. Hal ini sangat relevan bagi penyakit yang melibatkan disregulasi autofagi, seperti neurodegenerasi dan kanker, di mana perubahan pembentukan kompleks dapat mengganggu aliran autofagi atau memfasilitasi kelangsungan hidup tumor di bawah tekanan metabolik. Mengingat bahwa ATG101 berkontribusi dominan terhadap stabilitas ikatan, protein ini berpotensi menjadi target terapi yang layak atau penanda untuk modulasi autofagi. Selain itu, lanskap energetik yang diidentifikasi melalui FEP memberikan pedoman untuk studi mutagenesis di masa depan atau penyaringan molekul kecil yang bertujuan memodulasi interaksi ATG13–ATG101.

Dengan menggabungkan dinamika kasar (coarse-grained dynamics) dengan profil energetik, penelitian ini menawarkan perspektif terintegrasi mengenai perilaku kompleks autofagi dan mendukung upaya berkelanjutan untuk mengungkap logika molekuler regulasi autofagi selektif.

SIMPULAN

Penelitian ini menyajikan analisis komprehensif terhadap kompleks ATG13–ATG101 dengan menggunakan simulasi dinamika molekuler kasar (CG-MD) dan perhitungan Perturbasi Energi Bebas (FEP). Hasil penelitian kami mengonfirmasi ketahanan struktural dan perilaku antarmuka dinamis kompleks tersebut, terutama stabilitas yang diberikan oleh domain HORMA. Analisis spasial (RMSD, COM, g(r)) dan data termodinamika (ΔG) menegaskan peran stabilisasi dominan ATG101, terutama di bawah perubahan konformasi yang bergantung pada keadaan. Temuan ini memberikan wawasan mekanistik mengenai regulasi inisiasi autofagi dan menyarankan strategi potensial untuk penargetan terapeutik antarmuka protein-protein dalam jalur yang terkait dengan autofagi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Perhitungan dalam penelitian ini dilakukan dengan memanfaatkan fasilitas MAHAMERU BRIN HPC, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN). Para penulis mengucapkan terima

kasih atas dukungan dan sumber daya komputasi yang disediakan oleh BRIN.

DAFTAR PUSTAKA

Cao, W., Li, J., Yang, K., & Cao, D. (2021). An overview of autophagy: Mechanism, regulation and research progress. *Bulletin Du Cancer*, *108*(3), 304–322.

Chen, A., Song, Y., Zhu, W., Chen, K., Yang, M., Zhao, T., & Zhang, M. (2024). *Comprehensive Analysis*. *3*.

Chen, P., Liu, G., Yin, J., Sun, L., Wang, X., Wang, B., ... & Luo, K. (2026). Therapeutic Promise of Mitophagy in Cancer: Advancing from Small-Molecule Regulation to Nanotechnology-Enhanced Targeting Therapy. *Theranostics*, *16(8)*, *430*.

Fiesel, F. C., Fričová, D., Hayes, C. S., Coban, M. A., Hudec, R., Bredenberg, J. M., ... & Springer, W. (2023). Substitution of PINK1 Gly411 modulates substrate receptivity and turnover. *Autophagy*, 19(6), 1711–1732.

Goldsmith, J., Levine, B., & Debnath, J. (2014). Autophagy and cancer metabolism. In Methods in Enzymology (Vol. 542, pp. 25–57). *Academic Press Inc*. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416618-9.00002-9

Herawati, I. E., Lesmana, R., Levita, J., Subarnas, A., Ghifari, U. Al, Barat, J., Farmakologi, D., Farmasi, F., Padjadjaran, U., Barat, J., Padjadjaran, U., Barat, J., Padjadjaran, U., Barat, J., & Proses, P. (2022). *Jurnal Ilmiah Farmako Bahari Prediction Of Anticancer Activity Of Ricin-A Through Autophagy Pathway Using Molecular Docking On Beclin-1 , Lc3 , And P62 Interaksi Molekular Dari Ricin-A Dengan Beclin-1 , LC3* ,. 22–30.

Karaca, E., Prévost, C., & Sacquin-Mora, S. (2022). *Modeling the Dynamics of Protein–Protein Interfaces, How and Why? In Molecules (Vol. 27, Number 6). MDPI*. https://doi.org/https://doi.org/10.3390/molecules27061841

Kim, B. W., Jin, Y., Kim, J., Kim, J. H., Jung, J., Kang, S., Kim, I. Y., Kim, J., Cheong, H., & Song, H. K. (2018). *The C-terminal region of ATG101 bridges ULK1 and PtdIns3K complex inautophagyinitiation.Autophagy, 14(12),2104–2116.* https://doi.org/https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1504716

Kotani, T., & Nakatogawa, H. (2026). Core principles of autophagy initiation mechanisms. *Nature Structural & Molecular Biology*, *33*(3), 408–419.

La Serra, M. A., Vidossich, P., Acquistapace, I., Ganesan, A. K., & De Vivo, M. (2022). Alchemical Free Energy Calculations to Investigate Protein-Protein Interactions: the Case of the CDC42/PAK1 Complex. *Journal of Chemical Information and Modeling, 62(12), 3023–3033*. https://doi.org/https://doi.org/10.1021/acs.jcim.2c00348

Marrink, S. J., Risselada, H. J., Yefimov, S., Tieleman, D. P., & De Vries, A. H. (2007). The MARTINI force field: Coarse grained model for biomolecular simulations. *Journal of PhysicalChemistryB,111(27),7812–7824*. https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jp071097f

Marrink, S. J., Risselada, H. J., Yefimov, S., Tieleman, D. P., & De Vries, A. H. (2007). The MARTINI force field: Coarse grained model for biomolecular simulations. *Journal of Physical Chemistry B*, *111*(27), 7812–7824. https://doi.org/10.1021/jp071097f

Mittal, R., Karki, U., Lemos, J. R., Chapagain, P., & Hirani, K. (2026). Structural Modulation and Binding of HLA-DQ8 by Cysteine-to-Serine Mutated Insulin Peptide: Insights from Molecular Dynamics Simulations. *International Journal of Molecular Sciences*, 27(11), 4846.

Nguyen, A., & Faesen, A. C. (2024). The role of the HORMA domain proteins ATG13 and ATG101 in initiating autophagosome biogenesis. *FEBS Letters*, 598(1), 114–126.

Nurdin, R. A., & Masdar, R. (2025). Lysosomal Involvement in Autophagy as a Cellular Adaptation to Nutrient Stress. *Jurnal Biologi Babasal*, 23–31.

Popelka, H., & Klionsky, D. J. (2020). Molecular dynamics simulations reveal how the

reticulon- homology domain of the autophagy receptor RETREG1/FAM134B remodels membranes for efficient selective reticulophagy. *In Autophagy (Vol. 16, Number 4, Pp. 585–588).Taylor and Francis Inc*. https://doi.org/https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1719725

Poveda-Cuevas, S. A., Lohachova, K., Markusic, B., Dikic, I., Hummer, G., & M. Bhaskara, R. (2025). Janus-like behavior of intrinsically disordered regions in reticulophagy. *Autophagy*, *21*(3), 681–683.

Qi, S., Kim, D. J., Stjepanovic, G., & Hurley, J. H. (2017). Structure of the human Atg13-Atg101 HORMA heterodimer: An interaction hub within the ULK1 complex. *Structure, 23(10), 1848–1857*. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.str.2015.07.011

Qi, S., Kim, D. J., Stjepanovic, G., & Hurley, J. H. (2015). Structure of the human Atg13-Atg101 HORMA heterodimer: An interaction hub within the ULK1 complex. *Structure*, *23*(10), 1848–1857. https://doi.org/10.1016/j.str.2015.07.011

Siva Sankar, D., & Dengjel, J. (2021). *Protein complexes and neighborhoods driving autophagy*. *Autophagy,17(10),2689–2705.* https://doi.org/https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1847461

Souza, P. C. T., Alessandri, R., Barnoud, J., Thallmair, S., Faustino, I., Grünewald, F., Patmanidis, I., Abdizadeh, H., Bruininks, B. M. H., Wassenaar, T. A., Kroon, P. C., Melcr, J., Nieto, V., Corradi, V., Khan, H. M., Domański, J., Javanainen, M., Mar, S. J. (2021). *Martini 3: a general purpose force field for coarse-grained molecular dynamics.NatureMethods*.18(4),382–388. https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41592-021-01098-3

Souza, P. C. T., Alessandri, R., Barnoud, J., Thallmair, S., Faustino, I., Grünewald, F., Patmanidis, I., Abdizadeh, H., Bruininks, B. M. H., Wassenaar, T. A., Kroon, P. C., Melcr, J., Nieto, V., Corradi, V., Khan, H. M., Domański, J., Javanainen, M., Martinez-Seara, H., Reuter, N., … Marrink, S. J. (2021). Martini 3: a general purpose force field for coarse-grained molecular dynamics. *Nature Methods*, *18*(4), 382–388. https://doi.org/10.1038/s41592-021-01098-3

Wallot-Hieke, N., Verma, N., Schlütermann, D., Berleth, N., Deitersen, J., Böhler, P., Stuhldreier, F., Wu, W., Seggewiß, S., Peter, C., Gohlke, H., Mizushima, N., & Stork, B. (2018). *Systematic analysis of ATG13 domain requirements for autophagy induction*. *Autophagy*.14(5),743–763. https://doi.org/https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1387342

Wallot-Hieke, N., Verma, N., Schlütermann, D., Berleth, N., Deitersen, J., Böhler, P., Stuhldreier, F., Wu, W., Seggewiß, S., Peter, C., Gohlke, H., Mizushima, N., & Stork, B. (2018). Systematic analysis of ATG13 domain requirements for autophagy induction. *Autophagy*, *14*(5), 743–763. https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1387342

Zhu, F., Bourguet, F. A., Bennett, W. F. D., Lau, E. Y., Arrildt, K. T., Segelke, B. W., Zemla, A. T., Desautels, T. A., & Faissol, D. M. (2022). *Large-scale application of free energy perturbation calculations for antibody design. Scientific Reports*. *12*(1). https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41598-022-14443-z