



Pemanfaatan Pemodelan Struktur Protein dan Simulasi Dinamika Molekuler dalam Menganalisis Dampak Mutasi terhadap Struktur dan Stabilitas Protein: Suatu Tinjauan

Abdurrahman Ilyas Al Muflih

Universitas Padjadjaran, Sumedang, Indonesia

Email: abdurrahman22001@mail.unpad.ac.id

Abstrak

Mutasi asam amino dapat mengubah interaksi molekuler dan memengaruhi struktur, dinamika, serta stabilitas protein, tetapi dampaknya tidak selalu dapat dijelaskan melalui struktur statis. Tinjauan ini bertujuan mengkaji pemanfaatan pemodelan struktur protein dan simulasi dinamika molekuler untuk menganalisis konsekuensi mutasi pada tingkat molekuler. Kajian dilakukan melalui penelusuran dan sintesis literatur mengenai pemodelan struktur protein, prinsip simulasi dinamika molekuler, serta parameter analisis trajektori. Hasil kajian menunjukkan bahwa pemodelan struktur memberikan konteks spasial untuk mengidentifikasi perubahan pada residu dan lingkungan strukturalnya, sedangkan simulasi dinamika molekuler memungkinkan perubahan konformasi dan interaksi protein ditelusuri sepanjang waktu. Analisis RMSD, RMSF, Rg, struktur sekunder, SASA, hydrogen bond, jarak antarresidu, DCCM, dan PCA memberikan informasi yang saling melengkapi mengenai perubahan struktur dan dinamika protein. Integrasi kedua pendekatan tersebut dapat digunakan untuk menelusuri hubungan antara perubahan urutan asam amino, reorganisasi struktur dan interaksi molekuler, serta perubahan dinamika protein yang berkaitan dengan stabilitas dan fungsi biologis.

Kata kunci: mutasi protein; pemodelan struktur; dinamika molekuler; stabilitas protein; analisis struktural.

PENDAHULUAN

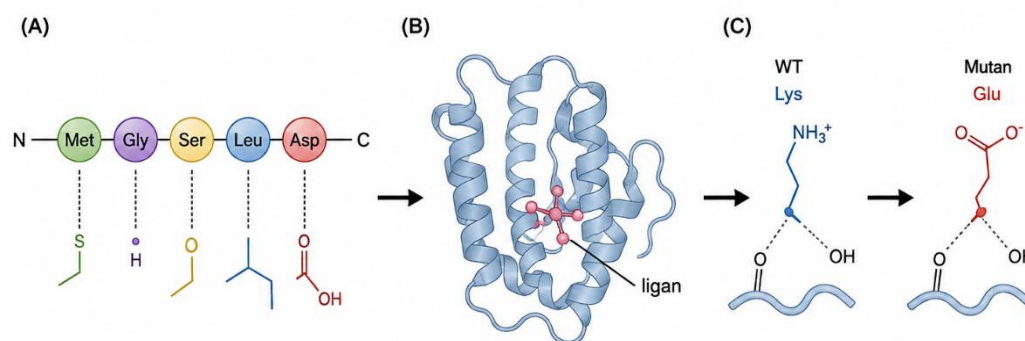
1. Struktur, Dinamika, dan Dampak Mutasi pada Protein

Protein merupakan makromolekul yang tersusun atas rantai polipeptida dengan residu asam amino yang memiliki karakteristik fisikokimia berbeda, seperti ukuran, hidrofobisitas, polaritas, dan muatan (Stollar & Smith, 2020; Qing *et al.*, 2022; Škrbić *et al.*, 2024). Distribusi karakteristik tersebut sepanjang sekuens menentukan kecenderungan interaksi antarrasidu dan dengan lingkungan molekulernya, yang selanjutnya membentuk organisasi tiga dimensi protein serta situs interaksi yang mendukung fungsi biologis (Kuhlman & Bradley, 2019; Kennedy *et al.*, 2022). Hubungan antara sekuens, struktur, dan fungsi tidak bersifat sepenuhnya linear karena protein merupakan sistem dinamis yang

dapat mengalami perubahan konformasi dalam menjalankan fungsinya (Kennedy et al., 2022). Protein pada kondisi fisiologis menempati suatu konformasi ensemble yang terdiri atas berbagai keadaan konformasi, dengan fluktuasi yang dapat berlangsung pada tingkat lokal hingga perubahan domain yang lebih besar (Rackovsky & Scheraga, 2020; Wei et al., 2016). Distribusi keadaan tersebut dipengaruhi oleh jaringan interaksi nonkovalen, termasuk interaksi hidrofobik, ikatan hidrogen, interaksi elektrostatik, gaya van der Waals, dan interaksi dengan pelarut, yang bersama-sama membentuk lanskap energi bebas protein (Li et al., 2014; Kazlauskas, 2018; Vascon et al., 2020).

Kerangka struktural dan dinamis tersebut menjelaskan mengapa perubahan satu residu dapat memengaruhi sifat molekuler protein. Substitusi asam amino dapat mengubah ukuran, polaritas, hidrofobisitas, atau muatan side chain sehingga memengaruhi interaksi lokal, termasuk ikatan hidrogen, interaksi elektrostatik, jembatan garam, dan packing antarrasidu (Akanuma et al., 2021; Alizadehmohajer et al., 2023; Panja et al., 2020; Ortega et al., 2021). Dampak perubahan tersebut bergantung pada posisi residu dan bentuk strukturalnya, sehingga substitusi yang sama dapat menghasilkan konsekuensi berbeda pada lingkungan protein yang berbeda, terutama ketika residu berada pada situs aktif atau antarmuka interaksi (Livesey & Marsh, 2022; Sotomayor-Vivas et al., 2022). Reorganisasi interaksi lokal dapat memengaruhi struktur, dinamika, stabilitas, maupun interaksi protein dengan molekul lain dan pada kondisi tertentu berujung pada perubahan fungsi biologis (Idowu et al., 2022; Sotomayor-Vivas et al., 2022). Mutasi sendiri tidak selalu menyebabkan perubahan struktur global yang besar; sebagian substitusi hanya menghasilkan perubahan lokal atau perubahan stabilitas yang relatif kecil, sedangkan mutasi lainnya dapat bersifat stabilisasi, destabilisasi, atau relatif netral (Bryant & Elofsson, 2020; Gerasimavicius et al., 2020; Broom et al., 2020; Tsuboyama et al., 2023).

Variasi respons tersebut menunjukkan bahwa perubahan sekuens, struktur, stabilitas, dan fungsi merupakan aspek yang saling berkaitan tetapi tidak identik (Teufl *et al.*, 2022). Hubungan tersebut menempatkan analisis struktur dan dinamika sebagai pendekatan penting untuk memahami dampak mutasi pada tingkat molekuler. Konsekuensi suatu substitusi lebih tepat dipahami sebagai rangkaian perubahan yang menghubungkan perubahan sifat fisikokimia residu dengan reorganisasi interaksi, perubahan struktur dan distribusi konformasi, serta perubahan stabilitas dan fungsi protein. Kerangka ini menjadi dasar penggunaan pendekatan struktural dan simulasi molecular dynamics untuk mengevaluasi bagaimana mutasi memengaruhi perilaku protein dalam ruang dan waktu, bukan hanya berdasarkan perbedaan struktur statis antara keadaan wild type dan mutan. Maka, hubungan antara mutasi dan fungsi protein t



Gambar 1 Hubungan antara urutan asam amino, struktur tiga dimensi, dan dampak substitusi asam amino terhadap interaksi molekuler protein. **(a)** Urutan asam amino dan karakteristik rantai samping, **(b)** struktur tiga dimensi protein dan interaksi dengan ligan, dan **(c)** perubahan karakteristik residu akibat substitusi asam amino.

2. Pemodelan Struktur Protein untuk Analisis Mutasi

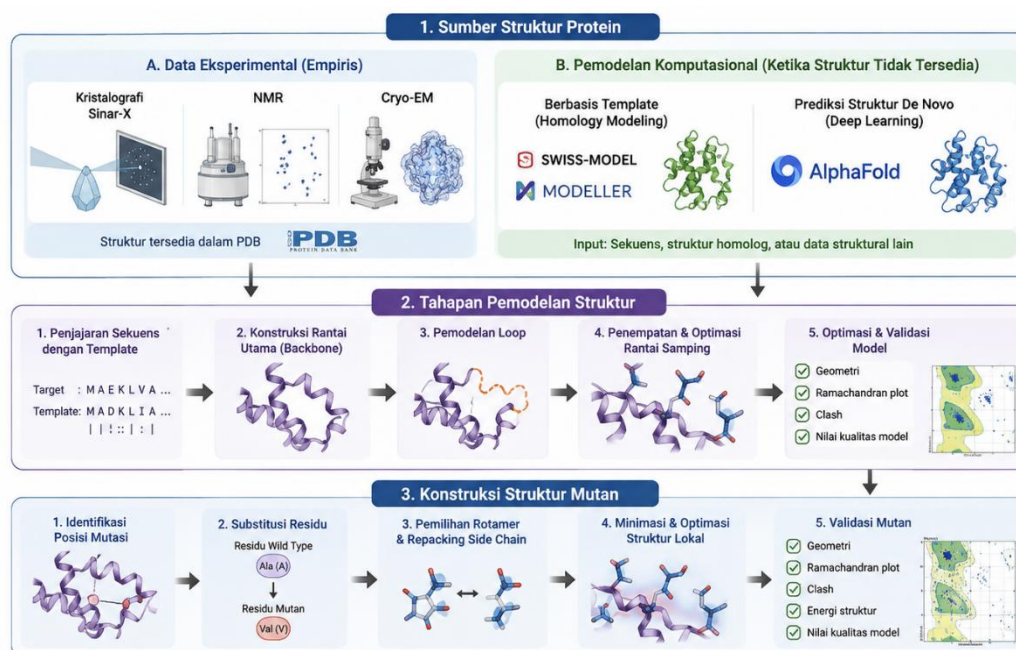
Struktur tiga dimensi protein menyediakan konteks spasial untuk memahami konsekuensi perubahan urutan asam amino, karena dampak suatu substitusi residu dapat dipengaruhi oleh posisi struktural, interaksi dengan residu di sekitarnya, serta lingkungan

lokal tempat residu tersebut berada (Akdel *et al.*, 2022); Baugh *et al.*, 2017). Struktur protein yang digunakan dalam analisis dapat diperoleh dari struktur eksperimental yang tersedia dalam *Protein Data Bank* (PDB) maupun dari model struktural yang dihasilkan melalui pendekatan komputasional, terutama ketika struktur eksperimental untuk protein target belum tersedia (Jumper *et al.*, 2021; Terwilliger *et al.*, 2024; Varadi *et al.*, 2024).

Metode eksperimental seperti kristalografi sinar-X, *nuclear magnetic resonance* (NMR), dan *cryo-electron microscopy* (cryo-EM) digunakan untuk memperoleh informasi struktural berdasarkan pengukuran eksperimental, sedangkan pendekatan komputasional dapat digunakan untuk memprediksi atau memodelkan struktur protein berdasarkan informasi sekuens, struktur homolog, maupun data struktural yang tersedia (Seffernick & Lindert, 2020; Ward *et al.*, 2021; Laurents, 2022; Ward *et al.*, 2021; Nam., 2023). Hameduh *et al.* (2020) dan (Haddad *et al.*, 2020). menjelaskan bahwa *homology modeling* mencakup penjajaran sekuens target dengan template, konstruksi rantai utama, pemodelan rantai samping, *loop*, serta optimasi dan validasi model. Kualitas *template* dan penjajaran menjadi faktor penting dalam menentukan kualitas struktur yang dihasilkan.

Pemodelan struktur protein dapat dilakukan melalui pendekatan berbasis template maupun prediksi struktur *de novo* berbasis pembelajaran mesin, dengan berbagai perangkat yang dikembangkan untuk masing-masing pendekatan. SWISS-MODEL dan MODELLER merupakan perangkat yang umum digunakan dalam comparative atau homology modeling, sedangkan AlphaFold dan pengembangannya menyediakan pendekatan berbasis *deep learning* untuk memprediksi struktur dari informasi sekuens. Tahapan pemodelan juga dapat mencakup pembangunan rantai utama, pemodelan *loop*, penempatan dan optimasi rantai samping, serta perbaikan struktur menggunakan perangkat yang sesuai dengan tujuan analisis (Hameduh *et al.*, 2020; Haddad *et al.*, 2020; Studer *et al.*, 2021). Perkembangan pembelajaran mendalam kemudian memungkinkan prediksi

struktur secara lebih luas melalui metode seperti AlphaFold, sehingga ketersediaan model struktural tidak lagi sepenuhnya bergantung pada keberadaan struktur eksperimental atau *template* homolog yang sesuai (Jumper *et al.*, 2021; Studer *et al.*, 2021). Pendekatan tersebut memperluas penerapan prediksi struktur dalam analisis variasi protein dan hubungan struktur-fungsi, meskipun interpretasinya tetap perlu mempertimbangkan tingkat kepercayaan model (Akdel *et al.*, 2022; Jänes & Beltrao, 2024). Kualitas struktur awal menjadi faktor penting dalam analisis mutasi karena ketidakakuratan model dapat memengaruhi hasil analisis berikutnya; Pan *et al.* (2022) menunjukkan bahwa kualitas *template* dan tingkat kesamaan sekuens dapat memengaruhi kemampuan model dalam memprediksi dampak mutasi terhadap stabilitas protein.



Gambar 2 Alur pemodelan struktur protein untuk analisis dampak mutasi.

Hubungan tersebut menempatkan analisis struktur dan dinamika sebagai pendekatan penting untuk memahami dampak mutasi pada tingkat molekuler. Konsekuensi suatu substitusi lebih tepat dipahami sebagai rangkaian perubahan yang menghubungkan perubahan sifat fisikokimia residu dengan reorganisasi interaksi,

perubahan struktur dan distribusi konformasi, serta perubahan stabilitas dan fungsi protein. Kerangka ini menjadi dasar penggunaan pendekatan struktural dan simulasi dinamika molekuler untuk mengevaluasi bagaimana mutasi memengaruhi perilaku protein dalam ruang dan waktu, bukan hanya berdasarkan perbedaan struktur statis antara keadaan normal dan mutasi.

3. Prinsip Dasar Simulasi Dinamika Molekuler

Metode simulasi dinamika molekuler merupakan metode simulasi komputasional yang memungkinkan perilaku dinamis sistem molekuler dipelajari melalui perubahan posisi atom terhadap waktu. Metode ini merepresentasikan atom sebagai artikel yang memiliki massa dan posisi tertentu, sedangkan interaksi antaratom direpresentasikan melalui fungsi energi potensial atau *force field* (Dohn *et al.*, 2020; Bereau, 2020; Schlick *et al.*, 2021; Oliveira *et al.*, 2021). Pergerakan setiap atom kemudian ditentukan berdasarkan hukum kedua Newton yaitu:

$$F = ma$$

dengan gaya yang bekerja pada atom diperoleh dari gradien negatif terhadap fungsi energi potensial sistem (Oliveira *et al.*, 2021).

Perhitungan energi dan gaya dalam simulasi MD ditentukan oleh *force field*, yaitu sekumpulan fungsi matematis dan parameter yang merepresentasikan interaksi molekuler berdasarkan koordinat atom (He *et al.*, 2022; Polêto & Lemkul, 2022; Wang *et al.*, 2024). Energi potensial total umumnya terdiri atas kontribusi bond, angle, dihedral, van der Waals, dan elektrostatik, yang secara sederhana dapat dinyatakan sebagai:

$$U_{total} = U_{bond} + U_{angle} + U_{dihedral} + U_{vdW} + U_{electrostatic}$$

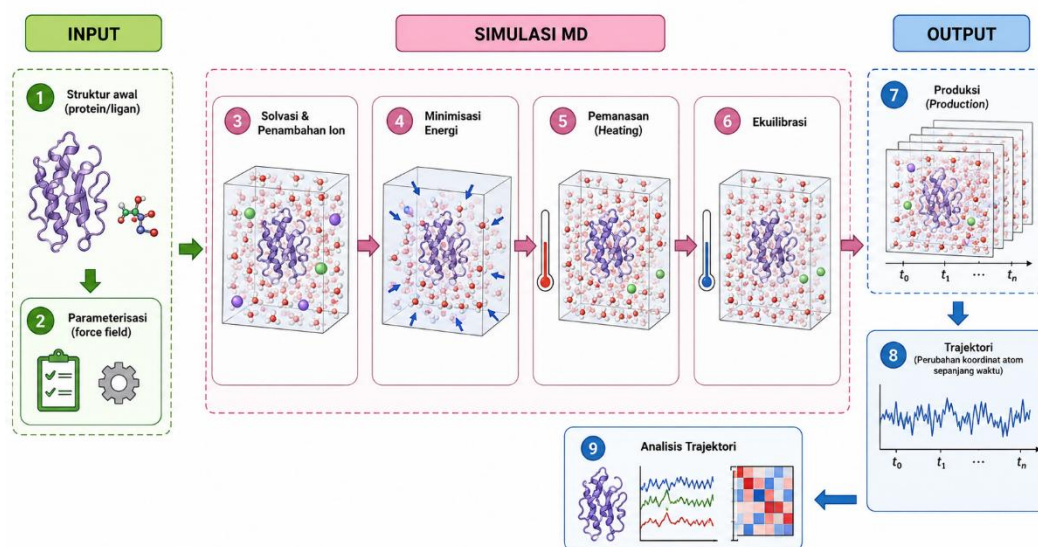
Energi potensial tersebut digunakan untuk menentukan gaya yang bekerja pada atom melalui hubungan $F_i = -\nabla_i U$, sehingga perubahan energi dapat diterjemahkan menjadi pergerakan atom sepanjang simulasi. *Force field* yang umum digunakan dalam

simulasi biomolekuler meliputi AMBER, CHARMM, dan OPLS, dengan formulasi dan parameterisasi yang disesuaikan dengan karakteristik sistem yang dimodelkan (Ren & Wang, 2022; Polêto & Lemkul, 2022; Wang *et al.*, 2024).

Simulasi diawali dengan penyiapan struktur awal dan parameterisasi sistem berdasarkan *force field* yang sesuai untuk merepresentasikan interaksi atom dalam protein, ligan, lipid, solvent, dan ion. Sistem kemudian disolvasi dengan model air yang sesuai dan ditambahkan ion hingga mencapai kondisi muatan serta konsentrasi ion yang ditentukan (Roe & Brooks, 2020; Lazim *et al.*, 2020). Penambahan *solvent* dan ion menghasilkan lingkungan molekuler yang lebih mendekati kondisi biologis sehingga sistem dapat digunakan untuk simulasi lebih lanjut (Zinovjev & van der Kamp, 2020; Pechlaner *et al.*, 2022). Struktur yang telah disolvasi kemudian menjalani minimisasi energi untuk mengurangi kontak atom yang tidak menguntungkan dan menghilangkan ketidakstabilan geometris akibat proses persiapan sistem. Sistem selanjutnya dipanaskan secara bertahap hingga mencapai temperatur target agar energi kinetik atom meningkat secara terkendali tanpa menghasilkan perubahan struktur yang tidak diinginkan. (Harvey *et al.*, 2020; Pechlaner *et al.*, 2022). Kondisi tersebut kemudian distabilkan melalui tahap ekuilibrasi dan dipanaskan melalui tahap pemanasan (*heating*), yang memungkinkan protein, *solvent*, ion, dan komponen sistem lainnya menyesuaikan diri terhadap temperatur, tekanan, dan volume yang ditetapkan sebelum simulasi produksi dilakukan (Harvey *et al.*, 2020; Zinovjev & van der Kamp, 2020; Pechlaner *et al.*, 2022).

Tahap terakhir pada simulasi adalah tahap produksi, yang dilakukan setelah sistem mencapai kondisi stabil dan menghasilkan trajektori yang merekam perubahan koordinat atom sepanjang waktu simulasi (Harvey *et al.*, 2020). Trajektori tersebut kemudian dianalisis untuk mengevaluasi karakteristik struktural dan dinamis protein. Rangkaian tahapan tersebut memungkinkan perubahan struktur dan dinamika protein ditelusuri secara

sistematis dari kondisi awal hingga menghasilkan data yang dapat digunakan untuk membandingkan perilaku protein normal dan mutan (Lazim *et al.*, 2020; Ormeño & General, 2024).



Gambar 3 Skematik tahapan simulasi dinamika molekuler

4. Parameter Analisis Struktur dan Dinamika Protein

Setelah protein menjalani tahapan simulasi, trajektori yang dihasilkan dapat dianalisis secara bertahap untuk mengidentifikasi perubahan struktural dan dinamis antara kondisi protein normal dan mutan. Analisis diawali dengan *Root Mean Square Deviation* (RMSD) untuk mengevaluasi perubahan konformasi protein terhadap struktur referensi dan melihat kestabilan relatif trajektori sepanjang simulasi (Lazim *et al.*, 2020; Pechlaner *et al.*, 2022). Perubahan konformasi yang teridentifikasi melalui RMSD kemudian dapat ditelusuri pada tingkat residu menggunakan *Root Mean Square Fluctuation* (RMSF), yang menunjukkan besarnya fluktuasi setiap residu sehingga region dengan perubahan fleksibilitas lokal dapat diidentifikasi (Periwal *et al.*, 2021; Abbad *et al.*, 2021). Fluktuasi residu tersebut selanjutnya dapat dikaitkan dengan tingkat kekompakan keseluruhan protein melalui *radius of gyration* (Rg), yang menggambarkan distribusi massa atom terhadap pusat massa protein (Periwal *et al.*, 2021; Abbad *et al.*, 2021). Karakteristik

kekompakan tersebut dapat dilengkapi dengan analisis struktur sekunder untuk mengidentifikasi perubahan keberlangsungan α -helix, β -sheet, turn, dan coil, serta *Solvent Accessible Surface Area* (SASA) untuk mengevaluasi perubahan luas permukaan protein yang dapat diakses oleh pelarut (Abbad *et al.*, 2021; Pechlaner *et al.*, 2022). Kombinasi parameter tersebut memungkinkan perubahan konformasi global, fleksibilitas lokal, kekompakan, organisasi struktur sekunder, dan paparan permukaan dianalisis secara komplementer sehingga perubahan pada satu parameter tidak digunakan sebagai bukti tunggal terjadinya destabilisasi protein.

Perubahan struktural yang teridentifikasi melalui parameter tersebut selanjutnya dapat ditelusuri pada tingkat interaksi molekuler untuk mengidentifikasi mekanisme yang mendasarinya. Analisis *hydrogen bond* dapat digunakan untuk mengevaluasi perubahan jumlah dan persistensi ikatan hidrogen yang berkontribusi terhadap stabilitas struktur, sedangkan residue–residue distance memungkinkan perubahan jarak antarresidu dipantau secara spesifik sehingga perubahan geometri lokal, termasuk pada wilayah situs pengikatan, dapat diidentifikasi (Abbad *et al.*, 2021; Sinha *et al.*, 2022). Perubahan interaksi dan geometri lokal tersebut kemudian dapat dikaitkan dengan pola gerakan antarrasidu melalui *dynamic cross-correlation analysis* (DCCM), yang menggambarkan hubungan korelasi, antikorelasi, atau gerakan yang relatif tidak berkorelasi antarresidu (Raghavan *et al.*, 2021; Bao *et al.*, 2023). Pola korelasi gerakan yang diperoleh selanjutnya dapat diringkas menggunakan *principal component analysis* (PCA) untuk mengidentifikasi modus gerakan dominan dan membandingkan ruang konformasi antara protein normal dan mutan (Raghavan *et al.*, 2021; Bao *et al.*, 2023). Integrasi parameter tersebut memungkinkan dampak mutasi ditelusuri secara bertahap dari perubahan konformasi global, fluktuasi residu, dan kekompakan protein hingga perubahan struktur sekunder, interaksi lokal, serta gerakan kolektif, sehingga interpretasi terhadap perubahan

struktural dan dinamis yang berkaitan dengan stabilitas atau fungsi protein dapat dilakukan secara lebih komprehensif (Lazim *et al.*, 2020; Sinha *et al.*, 2022; Ormeño & General, 2024).

5. Kesimpulan

Mutasi pada protein dapat mengubah sifat fisikokimia residu dan mengganggu interaksi molekuler di lingkungan sekitarnya, sehingga dampaknya dapat muncul pada struktur, dinamika, stabilitas, hingga fungsi protein. Pemahaman terhadap dampak tersebut memerlukan informasi mengenai posisi mutasi dalam struktur tiga dimensi serta perubahan perilaku protein yang tidak dapat sepenuhnya dijelaskan melalui pengamatan struktur statis. Pemodelan struktur protein menyediakan konteks spasial untuk mengidentifikasi perubahan pada residu yang mengalami mutasi, sedangkan simulasi dinamika molekuler memungkinkan perubahan konformasi dan interaksi protein ditelusuri sepanjang waktu.

Analisis trajektori hasil simulasi dapat dilakukan menggunakan berbagai parameter, seperti RMSD, RMSF, Rg, struktur sekunder, SASA, *hydrogen bond*, jarak antarresidu, DCCM, dan PCA. Setiap parameter memberikan informasi yang berbeda mengenai perubahan konformasi global, fleksibilitas lokal, kekompakan, interaksi molekuler, dan gerakan kolektif protein, sehingga penggunaannya secara terpadu dapat memberikan gambaran yang lebih menyeluruh mengenai konsekuensi mutasi. Integrasi pemodelan struktur dan simulasi dinamika molekuler dengan analisis berbagai parameter tersebut menjadi pendekatan komputasional yang dapat digunakan untuk menelusuri hubungan antara perubahan urutan asam amino, reorganisasi struktur dan interaksi molekuler, serta perubahan dinamika protein yang berkaitan dengan stabilitas dan fungsi biologis.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbad, M. A., et al. (2021). Effect of identified non-synonymous mutations in DPP4 receptor binding residues among highly exposed human population in Morocco to MERS-CoV through computational approach. *PLOS ONE*, 16(10), e0258750. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0258750>
- Akanuma, S., Yamaguchi, M., & Yamagishi, A. (2021). Comprehensive mutagenesis to identify amino acid residues contributing to the difference in thermostability between two originally thermostable ancestral proteins. *PLOS ONE*, 16(10), e0258821. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0258821>
- Akdel, M., Pires, D. E. V., Pardo, E. P., Jänes, J., Zalevsky, A. O., Mészáros, B., Bryant, P., Good, L. L., Laskowski, R. A., Pozzati, G., Shenoy, A., Zhu, W., Kundrotas, P., Ruiz Serra, V., Rodrigues, C. H. M., Dunham, A. S., Burke, D., Borkakoti, N., Velankar, S., ... Beltrao, P. (2022). A structural biology community assessment of AlphaFold2 applications. *Nature Structural & Molecular Biology*, 29, 1056–1067. <https://doi.org/10.1038/s41594-022-00849-w>
- Alizadehmohajer, N., Zahedifar, S., Sohrabi, E., Shaddel Basir, S., Nourigheimasi, S., Falak, R., Nedaeinia, R., Ferns, G. A., Emami Nejad, A., & Manian, M. (2023). Using in silico bioinformatics algorithms for the accurate prediction of the impact of spike protein mutations on the pathogenicity, stability, and functionality of the SARS-CoV-2 virus and analysis of potential therapeutic targets. *Biochemistry and Genetics*, 61(2), 778–808. <https://doi.org/10.1007/s10528-022-10282-9>
- Bao, H., Wang, W., Sun, H., & Chen, J. (2023). Probing mutation-induced conformational transformation of the GTP/M-RAS complex through Gaussian accelerated molecular dynamics simulations. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 38(1), 2195995. <https://doi.org/10.1080/14756366.2023.2195995>
- Bryant, P., & Elofsson, A. (2020). Decomposing structural response due to sequence changes in protein domains with machine learning. *Journal of Molecular Biology*, 432(16), 4435–4446. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.05.021>
- Broom, A., Trainor, K., Jacobi, Z., & Meiering, E. M. (2020). Computational modeling of protein stability: Quantitative analysis reveals solutions to pervasive problems. *Structure*, 28(6), 717–726.e3. <https://doi.org/10.1016/j.str.2020.04.003>
- Dohn, A. O. (2020). Multiscale electrostatic embedding simulations for modeling structure and dynamics of molecules in solution: A tutorial review. *International Journal of Quantum Chemistry*, 120(21), e26343. <https://doi.org/10.1002/qua.26343>
- Fuxreiter, M., Simon, I., Bondos, S., & Pons, J. (2021). Fuzziness and frustration in the energy landscape of protein folding, function, and assembly. *Nature Communications*, 12, 494.
- Gerasimavicius, L., Liu, X., & Marsh, J. A. (2020). Identification of pathogenic missense mutations using protein stability predictors. *Scientific Reports*, 10, 15387. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72404-w>

- Haddad, Y., Adam, V., & Heger, Z. (2020). Ten quick tips for homology modeling of high-resolution protein 3D structures. *PLoS Computational Biology*, 16(4), e1007449. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007449>
- Hameduh, T., Haddad, Y., Adam, V., & Heger, Z. (2020). Homology modeling in the time of collective and artificial intelligence. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 3494–3506. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.11.007>
- He, X., Walker, B., Man, V. H., Ren, P., & Wang, J. (2022). Recent progress in general force fields of small molecules. *Current Opinion in Structural Biology*, 72, 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2021.11.011>
- Idowu, K. A., Onyenaka, C., & Olaleye, O. A. (2022). A computational evaluation of structural stability of omicron and delta mutations of SARS-CoV-2 spike proteins and human ACE-2 interactions. *Informatics in Medicine Unlocked*, 33, 101074. <https://doi.org/10.1016/j.imu.2022.101074>
- Jänes, J., & Beltrao, P. (2024). Deep learning for protein structure prediction and design—Progress and applications. *Molecular Systems Biology*, 20(3), 162–169. <https://doi.org/10.1038/s44320-024-00016-x>
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Židek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596, 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Kazlauskas, R. J. (2018). Engineering more stable proteins. *Chemical Society Reviews*, 47(24), 9026–9045. <https://doi.org/10.1039/C8CS00014J>
- Kennedy, E. N., Foster, C. A., Barr, S. A., & Bourret, R. B. (2022). General strategies for using amino acid sequence data to guide biochemical investigation of protein function. *Biochemical Society Transactions*, 50(6), 1847–1858. <https://doi.org/10.1042/BST20220849>
- Laurents, D. V. (2022). AlphaFold 2 and NMR spectroscopy: Partners to understand protein structure, dynamics and function. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9, 906437. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.906437>
- Lazim, R., Suh, D., & Choi, S. (2020). Advances in molecular dynamics simulations and enhanced sampling methods for the study of protein systems. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 6339. <https://doi.org/10.3390/ijms21176339>
- Li, H., Xie, Y., Liu, C., & Liu, S. (2014). Physicochemical bases for protein folding, dynamics, and protein-ligand binding. *Science China Life Sciences*, 57(3), 287–302. <https://doi.org/10.1007/s11427-014-4617-2>

- Livesey, B. J., & Marsh, J. A. (2022). The properties of human disease mutations at protein interfaces. *PLoS Computational Biology*, 18(2), e1009858. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009858>
- Nam, K. H. (2023). AI-based protein models enhance the accuracy of experimentally determined protein crystal structures. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 10, 1208810. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2023.1208810>
- Norn, C., André, I., & Theobald, D. L. (2021). A thermodynamic model of protein structure evolution explains empirical amino acid substitution matrices. *Protein Science*, 30(10), 2057–2068. <https://doi.org/10.1002/pro.4155>
- Oliveira, A. S. F., et al. (2021). Dynamical nonequilibrium molecular dynamics reveals the structural basis for allostery and signal propagation in biomolecular systems. *European Physical Journal B*.
- Ortega, G., Aguilar, M. A., Gautam, B. K., & Plaxco, K. W. (2021). The effect of charged residue substitutions on the thermodynamics of protein-surface interactions. *Protein Science*, 30(12), 2408–2417. <https://doi.org/10.1002/pro.4215>
- Ormeño, F., & General, I. J. (2024). Convergence and equilibrium in molecular dynamics simulations. *Communications Chemistry*, 7, 26. <https://doi.org/10.1038/s42004-024-01114-5>
- Panja, A. S., Maiti, S., & Bandyopadhyay, B. (2020). Protein stability governed by its structural plasticity is inferred by physicochemical factors and salt bridges. *Scientific Reports*, 10, 1822. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58825-7>
- Pan, Q., Nguyen, T. B., Ascher, D. B., & Pires, D. E. V. (2022). Systematic evaluation of computational tools to predict the effects of mutations on protein stability in the absence of experimental structures. *Briefings in Bioinformatics*, 23(2), bbac025. <https://doi.org/10.1093/bib/bbac025>
- Pechlaner, M., van Gunsteren, W. F., Hansen, N., & Smith, L. J. (2022). Molecular dynamics simulation or structure refinement of proteins: Are solvent molecules required? A case study using hen lysozyme. *European Biophysics Journal*, 51, 265–282. <https://doi.org/10.1007/s00249-022-01593-1>
- Periwal, N., Rathod, S. B., Pal, R., Sharma, P., Nebhnani, L., Barnwal, R. P., Arora, P., Srivastava, K. R., & Sood, V. (2021). In silico characterization of mutations circulating in SARS-CoV-2 structural proteins. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 40(18), 8216–8231. <https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1908170>
- Polêto, M. D., & Lemkul, J. A. (2022). Integration of experimental data and use of automated fitting methods in developing protein force fields. *Communications Chemistry*.
- Qing, R., Hao, S., Smorodina, E., Jin, D., Zalevsky, A., & Zhang, S. (2022). Protein design: From the aspect of water solubility and stability. *Chemical Reviews*, 122(18), 14085–14179. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00757>

- Rackovsky, S., & Scheraga, H. A. (2020). The structure of protein dynamic space. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(33), 19938–19942. <https://doi.org/10.1073/pnas.2008873117>
- Raghavan, S. S., Iqbal, S., Ayyadurai, N., & Gunasekaran, K. (2021). Insights in the structural understanding of amyloidogenicity and mutation-led conformational dynamics of amyloid beta (A β) through molecular dynamics simulations and principal component analysis. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 40(12), 5577–5587. <https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1871955>
- Roe, D. R., & Brooks, B. R. (2020). A protocol for preparing explicitly solvated systems for stable molecular dynamics simulations. *The Journal of Chemical Physics*, 153(5), 054123. <https://doi.org/10.1063/5.0013849>
- Schlick, T., Portillo-Ledesma, S., Myers, C. G., Beljak, L., Chen, J., Dakhel, S., Darling, D., Ghosh, S., Hall, J., Jan, M., Liang, E., Saju, S., Vohr, M., Wu, C., Xu, Y., & Xue, E. (2021). Biomolecular modeling and simulation: A prospering multidisciplinary field. *Annual Review of Biophysics*, 50, 267–301. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-091720-102019>
- Seffernick, J. T., & Lindert, S. (2020). Hybrid methods for combined experimental and computational determination of protein structure. *The Journal of Chemical Physics*, 153(24), 240901. <https://doi.org/10.1063/5.0026025>
- Sinha, S., Qin, Z., Tam, B., & Wang, S. M. (2022). Identification of deleterious variants of uncertain significance in BRCA2 BRC4 repeat through molecular dynamics simulations. *Briefings in Functional Genomics*, 21(3), 202–215. <https://doi.org/10.1093/bfgp/elac003>
- Sotomayor-Vivas, C., Hernández-Lemus, E., & Dorantes-Gilardi, R. (2022). Linking protein structural and functional change to mutation using amino acid networks. *PLOS ONE*, 17(1), e0261829. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261829>
- Studer, G., Tauriello, G., Bienert, S., Biasini, M., Johner, N., & Schwede, T. (2021). ProMod3—A versatile homology modelling toolbox. *PLoS Computational Biology*, 17(1), e1008667. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1008667>
- Stollar, E. J., & Smith, D. P. (2020). Uncovering protein structure. *Essays in Biochemistry*, 64(4), 649–680. <https://doi.org/10.1042/EBC20190042>
- Škrbić, T., Giacometti, A., Hoang, T. X., Maritan, A., & Banavar, J. R. (2024). Amino-acid characteristics in protein native state structures. *Biomolecules*, 14(7), 805. <https://doi.org/10.3390/biom14070805>
- Teufel, M., Zajc, C. U., & Traxlmayr, M. W. (2022). Engineering strategies to overcome the stability–function trade-off in proteins. *ACS Synthetic Biology*, 11(3), 1030–1039. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.1c00512>

- Terwilliger, T. C., Liebschner, D., Croll, T. I., Williams, C. J., McCoy, A. J., Poon, B. K., Afonine, P. V., Oeffner, R. D., Richardson, J. S., Read, R. J., & Adams, P. D. (2024). AlphaFold predictions are valuable hypotheses and accelerate but do not replace experimental structure determination. *Nature Methods*, 21, 110–116. <https://doi.org/10.1038/s41592-023-02087-4>
- Thirumalai, D., O'Brien, E. P., Morrison, G., & Hyeon, C. (2010). Theoretical perspectives on protein folding. *Annual Review of Biophysics*, 39, 159–183. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-051309-103835>
- Tsuboyama, K., Dauparas, J., Chen, J., Laine, E., Mohseni Behbahani, Y., Weinstein, J. J., Mangan, N. M., Ovchinnikov, S., & Rocklin, G. J. (2023). Mega-scale experimental analysis of protein folding stability in biology and design. *Nature*, 620(7973), 434–444. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06328-6>
- Varadi, M., Bertoni, D., Magana, P., Paramval, U., Pidruchna, I., Radhakrishnan, M., Tsenkov, M., Nair, S., Mirdita, M., Yeo, J., Kovalevskiy, O., Tunyasuvunakool, K., Laydon, A., Židek, A., Tomlinson, H., Hariharan, D., Abrahamson, J., Green, T., Jumper, J., ... Velankar, S. (2024). AlphaFold Protein Structure Database in 2024: Providing structure coverage for over 214 million protein sequences. *Nucleic Acids Research*, 52(D1), D368–D375. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad1011>
- Vascon, F., Gasparotto, M., Giacomello, M., Cendron, L., Bergantino, E., Filippini, F., & Righetto, I. (2020). Protein electrostatics: From computational and structural analysis to discovery of functional fingerprints and biotechnological design. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 1774–1789. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.06.029>
- Ward, A. B., et al. (2021). Integrative structural biology in the era of accurate structure prediction. *Journal of Molecular Biology*, 433(20), 167127. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167127>
- Wang, L., Behara, P. K., Thompson, M. W., Gokey, T., Wang, Y., Wagner, J. R., Cole, D. J., Gilson, M. K., Shirts, M. R., & Mobley, D. L. (2024). The Open Force Field Initiative: Open software and open science for molecular modeling. *The Journal of Physical Chemistry B*, 128(29), 7043–7067. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.4c01558>
- Wei, G., Xi, W., Nussinov, R., & Ma, B. (2016). Protein ensembles: How does nature harness thermodynamic fluctuations for life? The diverse functional roles of conformational ensembles in the cell. *Chemical Reviews*, 116(11), 6516–6551. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00562>
- Zinovjev, K., & van der Kamp, M. W. (2020). Enlighten2: Molecular dynamics simulations of protein–ligand systems made accessible. *Bioinformatics*, 36(20), 5104–5106. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa643>