

Abstract of thesis presented to the Senate of Universiti Malaysia Terengganu in fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy

Computational Analysis of Rhomboid Protease of Extremophiles from Hot Springs and Antarctica

BELAL MOHAMMED ABD AL RHMAN AL SHOMALI

October 2023

**Main Supervisor : Associate Professor Ts. Dr. Muhd Danish Daniel
Abdullah, Ph.D**

Co-Supervisor : Associate Professor Dr. Wong Li Lian, Ph.D

Co-Supervisor (2) : Professor. Dr. Yves Van De Peer, Ph.D

**School/Institute : Institute Of Climate Adaptation And Marine
Biotechnology**

Rhomboid Protease (Rho) stability is determined by their amino acid content, protein structure, oligomerization, strong interactions, salt bridges, and bonding patterns. One amino acid change can affect the protein's tertiary fold. Rhomboids are intramembrane serine proteases that cleave misfolded membrane substrates. They are essential in growth factor signaling, mitochondrial homeostasis, protein quality regulation, and parasite invasion. Their critical roles in eukaryotes are well understood, but their contribution to bacterial physiology is not. They play a significant role in the pathophysiology of many diseases like type II diabetes and Parkinson's disease. Studying these proteins and their inhibitors will improve future drug targeting of this Rho. Hence, this study was carried out to analyse Rho from Hot Springs and Antarctica by computational approaches. JGI and IMG databases retrieved thermophilic protease sequences, while PATRIC retrieved Antarctic Rho. MAFFT aligned sequences. InterProScan analyzed all protein domains, while ProtParam identified protease amino acid frequencies. I-TASSER predicts 3D protein structure; CB-Dock, Pymol, and Discovery Studio for dock and simulation. Multiple alignments of the rhomboid

showed similarities between hot spring and Antarctica isolates, limiting protein evolution at high and low temperatures. The isolations had substantially conserved amino acid composition and active domains. Rhomboids' fundamental structure and functional locations have remained unchanged in almost all life forms, retaining their proteolytic activity. Rho isolated from hot-springs's 3D structure is more stable than Rho isolated from Antarctica's. Asn 62, Trp 57, Ile 143, Phe (61, 100), Leu 99, and Arg 284 were critical amino acid residues in Rho isolated from hot springs. Leu (292, 251, 252, 289) and Val (288) were crucial to Rho isolated from Antarctica. The results support that the Rho is highly conserved in its structure and function despite its presence in hot or cold environments. The Rho inhibitors are more active on rhomboids isolated from hot springs, demonstrating a need for substantially improved compounds.

Abstrak tesis yang dikemukakan kepada Senat Universiti Malaysia Terengganu sebagai memenuhi keperluan untuk Ijazah Doktor Falsafah

Analisis Komputeran Protease Rhomboid Ekstremofil dari Mata Air Panas dan Antartika

BELAL MOHAMMED ABD AL RHMAN AL SHOMALI

October 2023

Penyelia : Profesor Madya Ts. Dr. Muhd Danish Daniel Abdullah

Penyelia Bersama : Profesor Madya Dr. Wong Li Lian, Ph.D

Penyelia Bersama² : Profesor.Dr. Yves Van de Peer

Pusat Pengajian/Institut : Institut Adaptasi Iklim dan Bioteknologi Marin

Kestabilan protease rhomboid (Rho) ditentukan oleh kandungan asid aminonya, struktur protein, oligomerisasi, interaksi kuat, jambatan garam, dan corak ikatan. Satu perubahan asid amino boleh menjejaskan lipatan tertier protein. Rhomboid ialah protease serin intramembran yang membelah substrat membran yang salah lipatan. Mereka mempunyai peranan penting dalam isyarat faktor pertumbuhan, homeostasis mitokondria, peraturan kualiti protein, dan pencerobohan parasit. Peranan kritikal mereka dalam eukariota difahami dengan baik, tetapi sumbangan mereka kepada fisiologi bakteria tidak. Mereka memainkan peranan penting dalam patofisiologi banyak penyakit seperti diabetes jenis II dan penyakit Parkinson. Mengkaji protein ini dan perencatnya akan menambahbaik penargetan dadah untuk Rho pada masa hadapan. Oleh itu, kajian ini telah dijalankan untuk menganalisis Rho dari Mata Air Panas dan Antartika dengan pendekatan komputeran. Jujukan protease telah diperolehi daripada pangkalan data JGI dan IMG, manakala PATRIC digunakan untuk mendapatkan gen protease rhomboid Antartika. MAFFT pula digunakan untuk tujuan penjajaran jujukan. InterProScan digunakan untuk menganalisis semua domain protein, manakala ProtParam digunakan untuk mengenal pasti frekuensi asid amino

protease. I-TASSER digunakan untuk meramalkan struktur protein 3D. CB-Dock, Pymol dan Discovery Studio untuk analisis pengedokan dan simulasi. Penjajaran berbilang gen rhomboid menunjukkan persamaan antara pencilan mata air panas dan Antartika, menghadkan evolusi protein pada suhu tinggi dan rendah. Pencilan-pencilan telah mengekalkan komposisi asid amino dan domain aktif dengan ketara. Struktur asas dan lokasi fungsi rhomboid kekal tidak berubah dalam hampir semua bentuk hidupan, mengekalkan aktiviti proteolitiknya. Struktur 3D Rho yang terpencil daripada mata air panas lebih stabil berbanding Rho daripada Antartika. Asn 62, Trp 57, Ile 143, Phe (61, 100), Leu 99, dan Arg 284 adalah residu asid amino kritikal dalam Rho daripada mata air panas. Leu (292, 251, 252, 289) dan Val (288) pula kritikal bagi Rho daripada Antartika. Hasil kajian ini menyokong bahawa protease rhomboid sangat terpelihara dalam struktur dan fungsinya walaupun berada dalam persekitaran panas dan sejuk. Perencat protease rhomboid adalah lebih aktif pada rhomboid yang terdapat di mata air panas menunjukkan bahawa terdapat keperluan ketara untuk penambahbaikan pada sebatian ini.